

## SEKRETUAR OTİTİS MEDIA'DA ABERRAN BAKTERİ FORMLARININ ROLÜ

### THE ROLE OF THE ABERRANT FORMS OF BACTERIA IN SECRETORY OTITIS MEDIA

Dr.Haluk ATAÖĞLU\*, Dr.Nebil GÖKSU, Dr.Yusuf KEMALOĞLU,  
Dr.Muzaffer GÖZ\*, Dr.M.Suat ÖZBİLEN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji\* Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
Gazi Tıp Dergisi 2 : 117-122, 1991

**ÖZET :** Orta kulakta lokal ya da genel enfeksiyon belirtileri olmadan sıvı toplanması hali olan sekretuar otitis media (SOM) pek çok teori ile izah edilmeye çalışılmakla birlikte orta kulak mukozasının enfeksiyon ve inflamasyonunun bu klinik tablonun gelişmesinde önemli bir rol oynadığı günümüzde bilinmektedir. Bugüne kadar orta kulak efüzyonundan yapılan bakteriyolojik analizlerde yüksek oranda negatif kültürün olması ancak orta kulak efüzyonunda iltihabi hücrelerin, immünglobulinlerin ve komplemanların saptanması araştırmacılara konvansiyonel kültür metodları ile tespit edilemeyen organizmaların olayın sebebi olabileceğini düşündürmüştür. Anaerop bakteriler ve viruslar üzerinde durulmuş; ancak az sayıda olguda bu ajanlar üretilenmiştir. Hücre duvarına etkili olan antibiyotiklerin kullanılması veya enzimlerin etkisi ile aberran bakteri formları olarak bilinen sferoplast veya protoplastların ortaya çıktığı ve bu hücre duvarı olmayan bakteri formlarının ancak hipertonic besi yerlerinde üretilebileceği bilinmektedir. Bu sebeple bu çalışmada hepsi parasentez endikasyonu konmadan önce hücre duvarına etkili antibiyotikler ile tedavi edilmiş olan 18 hastaya ait 28 kulaktan alınan efüzyon materyali hipertonic thio glycolatte ve brain hearth infüzyon (BHI) besi yerlerine ekilmiştir. BHI besi yerlerinde % 92.86 kulakta üreme olmazken hipertonic besi

**SUMMARY :** The infection - inflammation theory is the most accepted one as an aethiopathogenic factor of secretory otitis media (SOM). Although high percentages of negative cultures were reported in previous bacteriological studies, strong evidences indicate the infectious basis of this disease, among these are the infectious cells, immunoglobulins and components of various types. Thus the possibility of microorganisms, namely bacteria, which can not be cultured by conventional methods seem to be logical. Anaerobic microorganisms and viruses were reported only in few cases in some reports.

Using antibacterial agents that destroy bacterial cell wall or by the effects of some enzymes, some aberrant or atypical forms of bacteria, known as spheroplast or protoplast, are formed. These bacterial forms could be cultured and reproduced and thus identified by means of hypertonic broths. In this study, the effusion obtained from 28 ears of 18 patients treated for SOM with anti - cell wall antibacterial agents were cultured using hypertonic thio glycollate and brain heart infusion (BHI) broths. While 92.86 % of effusions were culture negative using BHI broth, 32.14 % of these effusions showed positive bacterial reproduction with hypertonic thio glycollate broths. Thus as a

yerlerinde % 32.14 kulakta üreme ile karşılaştık. Bu sonuç bize orta kulak efüzyonlarında duvarını kaybetmiş aberran bakteri formlarının da bulunabileceğini ve bu formların uygun ortam oluştuğunda tekrar patojenite kazanarak akut enfeksiyon tabloları ortaya çıkarabileceğini düşündürmüştür.

**Anahtar Kelimeler :** Efüzyonlu Otitis Media, Protoplast, Sferoplast.

## GİRİŞ

İntakt kulak zarı arkasında sıvı toplanması, iletim tipi işitme kaybı, kulak zarında retraksiyon ve akut otit atakları ile karakterize olan klinik tablo, efüzyonlu otitis media (EOM) veya sekretuar otitis media (SOM) olarak bilinir (Van Cauwenberg, 1986). En sık olarak 3-6 yaş grubunda görülen SOM çocukluk devresinin sık rastlanan hastalıklarından birisidir (Akyıldız, 1977; Sade, 1979).

1867 de Politzer'in ex-vacuo teorisinden bu yana orta kulakta lokal ya da genel enfeksiyon belirtileri olmaksızın, sıvı toplanması olayı pek çok şekilde izah edilmeye çalışılmıştır. Günümüzde Senturia'nın enfeksiyon - inflamasyon teorisi (1958) ve Sade'nin klerens yetmezliği teorisi (1974) en kabul gören görüşlerdir (Akyıldız, 1977; Sade, 1979; Toss, 1982).

SOM 1958 de Senturia'nın orta kulak efüzyon (OKE)'lerinden pozitif bakteri kültürü elde etmesine kadar steril otitis media olarak biliniyordu (Senturia, 1958). Günümüzde tekrarlayan AOM atakları ile SOM'nın gelişmesi arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Ancak AOM'nın bakteriyel bir enfeksiyon ile meydana geldiği bilinirken SOM'nın bakteriyolojik yönü halen tartışmaya açıktır (Klein, 1981).

İnfeksiyon - inflamasyon teorisinin en kuvvetli kanıtları, OKE da çeşitli boyalar ile ölü bakterilerin varlığının gösterilmiş olmasıdır (Giebink, 1980). Ayrıca bu ölü mikroorganizmaların kapsid antijenleri bir süre orta kulakta kalarak lökositlerin kemotaktik (Giebink, 1980; Van Cauwenberg, 1986) ve bakterisid etkilerini inhibe ettikleri ve toksinleri ile de mukozal silyer aktiviteyi bozdukları bilinmektedir (Karja, 1983).

Senturia'dan bu yana yapılmış olan bakteriyolojik analizlerde OKE da en sık olarak S. pneumoniae, H. influenza ve S. pyogenes'a rastlanmakla birlikte (Sade, 1979), oldukça yüksek oranda negatif

conclusion, the existence cell wall free bacteria in middle ear effusions, which are potentially pathogenetic in proper conditions, is responsible for this chronic and insidious disease.

**Key Words:** Otitis Media With Effusion, Protoplast, Sferoplast.

kültür ile de karşılaşılmaktadır (Tablo 1) (Sade 1979, Bernstein, 1980; Karma, 1986; Ovanberg, 1990). Kültürün negatif olduğu durumlarda da OKE'da nötrofil, lenfosit ve makrofaj ile immünglobulinlerin ve komplemanların saptanması, enfeksiyon - inflamasyon teorisini desteklemektedir (Bernstein, 1980). Bakteri üremesi AOM atakları sırasında SOM'lı olgulara göre daha fazla olmaktadır. SOM olgularında OKE'da bakteri kültürünün azımsanmayacak oranda negatif olması konvansiyonel kültür metodları ile tespit edilemeyen organizmaların olayın sebebi olabileceğini pek çok araştırmacıya düşündürmüştür ve bu sebeple anaerob bakteriler ve viruslar gibi normal vasatlarda üretilmeyen mikroorganizmalar üzerinde durulmuş ise de çok az olguda virus izole edilmiş ve anaeroplardan nadiren üretilmiştir (Adlington, 1980; Giebink, 1979; Karma, 1986; Teel, 1980).

Hücre duvarına etkili antibiotik kullanımına bağlı olarak mikroorganizmaların hücre duvarını kaybederek sferoplast veya protoplast haline geçtiği, ve uygun ortamda hayatini bu şekilde sürdürdüğü bilinmektedir (Feingold, 1969). Bu hücre duvarından yoksun mikroorganizma formlarının, konvansiyonel yöntemlerle alınan materyallerden yapılan kültürlerde, etki altında bulunan mikroorganizmanın fragil olmasından dolayı, üreme olmayacaktır. Bu mikroorganizma formlarının üretimi, ancak hipertonic besiyerlerinde mümkündür (Sharp, 1870).

Biz bu çalışmamızda tıbbi tedavi ile iyileşme sağlanmayan ve parasentez endikasyonu konan olgulardan elde edilen orta kulak efüzyonlarını hipertonic besi yerleri kullanarak üretmeye ve böylece SOM'da yüksek oranda karşılaşılan negatif kültür sorununa yeni bir bakış açısı getirmeye çalıştık.

## MATERYAL METOD

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak - Burun - Boğaz Anabilim Dalında parasentez yapılan 18 hastaya (13 kadın, 5 erkek) ait 28 ku-

	KOKKO	LIU	HEALY	BERNSTEIN		KARMA	
	(1974)	(1976)	(1977)	S	SM	M	(1986)
Streptococcus	%	%	%	%	%	%	%
- pneumonia	8	10	24	-	-	-	16.3
- group A.	-	2	-	-	6	-	7.2
Staphylococcus	%	%	%	%	%	%	%
- epidermidis	20	15	36	50	20	9	11.5
- aureus	20	8	0	-	-	9	9.2
H. influenzae	%	%	%	%	%	%	%
	27	26	17	-	6	9	17.9
B. catarrhalis	%	%	%	%	%	%	%
	6	9	9	*	*	*	7.2
Gram negatif enterik basiller	%	%	%	%	%	%	%
	12	4	-	-	6	-	*
Difteroidler	%	%	%	%	%	%	%
	-	20	9	37.5	26.7	27.3	*
Diğerleri	%	%	%	%	%	%	%
	*	*	*	-	6	9	*
Negative	%	%	%	%	%	%	%
	78	48	64	25	53.3	36.4	65.3
Hasta Sayısı	322	120	42	8	15	11	608

Tablo - 1 : Değişik araştırmacılar tarafından orta kulak efüzyonlarında yapılmış olan bakteriyolojik analizlerde tespit edilen değişik mikroorganizmaların yüzdelerinin karşılaştırılması (S : seröz, SM : serömüköz, M : müköz efüzyon, \* : Araştırmacı tarafından bakteriyolojik analize dahil edilmemiştir).

laktan alınan efüzyon materyalinin Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bakteriyolojik incelenmesi yapılmıştır. SOM tanısı ile parasentez yapılan olguların yaş ortalaması 13.83 (5 - 60) dür.

SOM tanısı ile parasentez yapılan olguların hepsi en son geçirdikleri AOM atağının ardından en az 3 aylık bir süre geçmiş olan olgulardır. Bütün olgular  $\beta$ -laktamaza dirençli antibiyotikler (katkılı ampicilin veya cefaclor) ve steroid (prednizon ilk iki gün 1 mg/kg, izleyen günlerde 0.5 mg/kg olmak üzere 10 gün süre ile) ile tedavi edilmişlerdir. 3 aylık takip süresi sonunda OKE'nun gerilemediği olgulara parasentez yapılmıştır.

Parasentez öncesinde povidone - iodine ile dış kulak yolu doldurulmuş ve müteakiben serum fizyolojik ile irrije edilmiştir. Daha sonra, kulak zarının arka alt kadrından 18 veya 20 gauge iğne

ile girilerek efüzyon enjektöre aspire edilmiştir. Aşırı mukoid (glue) efüzyonlar ise kulak zarına parasentez yapılarak küret yardımı ile alınmışlardır. Bu işlemler sırasında gerek iğnenin gerekse küretin ucunun dış kulak yoluna temas etmemesine dikkat edilmiştir.

Alınan efüzyon hipertonic thioglycollate ve brain heart infüzyon besiyerlerine ekilmiştir. Besi yerleri şu şekilde hazırlanmıştır:

1) **Hipertonik thioglycollate broth** (Brewer's modified formula; DIFCO, 0432-01, gr/lit) : 24 gr thioglycollate broth 200 gr sucrose ve 2 gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  105 °C da 45 dakika steril edildikten sonra steril inaktive at serumu (100 u/ml) ve extraglobuler (10 cc) ilave edilmiştir.

2) **Brain heart infusion (BHI) broth** (DIFCO, 0037-01) : 37 gr. BHI ve 10 gr glukoz 110 °C de 30

dakikada steril edildikten sonra aseptik şartlarda % 1 oranında extraglobuler ilave edilmiştir.

Hemofilus genusuna dahil bakterilerin üremesini sağlamak için bu besi yerlerine ayrıca X ve V faktörlerini içeren ekstraglobüler % 1 oranında katılmıştır. Üreme gözlenen tüplerden ayrıca kanlı agara aerop ve anaerop, Mac Conkey agara ve çukolata agara pasajlar yapılmış ve üreme, boyama ve biyokimyasal özelliklerine göre mikroorganizmaların teşhisine gidilmiştir.

## SONUÇLAR

BHI besi yerinde 26 (% 92.86) olguda üreme tespit edilemedi, hipertonic besi yerinde ise 19 (% 67.86) olguda - üreme olmazken 9 (% 32.1) 4 kulakta aberran formda üreme ile karşılaşıldı. Bir olguda hipertonic besiyerinde 2 ayrı mikroorganizmaya ait aberran formlar ürerken diğerlerinde bir tek mikroorganizma ile karşılaşıldı. Sadece 2 olguda her iki besiyerinde de üreme olmuştu (Tablo 2). Bunlardan bir tanesinde her iki vasatta da aynı ajan

Olgular	Kulak	Efüzyon Tipi	B E S İ Y E R İ	
			BHI	Thioglycollate
H.S.	sol	yok	-	-
A.A.	sağ	yok	-	-
E.E.	sağ	yok	-	-
	sol	yok	-	-
A.Ö.G.	sağ	glue	-	Corynebacterium spp.
	sol	glue	-	Corynebacterium spp.
A.B.B.	sol	glue	-	koag. (-) Staphyl.
A.K.	sol	yok	koag. (-) Staphyl.	Corynebacterium spp.
	sağ	yok	-	-
N.A.	sol	seröz	-	koag. (-) Staphyl.
	sağ	seröz	koag. (-) Staphyl.	koag. (-) Staphyl.
H.T.	sağ	yok	-	-
M.Ö.	sol	glue	-	-
	sağ	glue	-	-
G.D.	sol	yok	-	koag. (-) Staphyl.
Z.Ö.	sol	glue	-	-
	sağ	glue	-	-
Y.C.	sağ	seröz	-	-
E.K.	sol	seröz	-	-
O.Ç.	sağ	glue	-	-
N.A.	sol	glue	-	-
	sağ	yok	-	-
Z.K.	sağ	seröz	-	-
M.K.	sol	yok	-	-
	sağ	glue	-	-
Ö.S.	sol	seröz	-	koag. (-) Staphyl. Corynebacterium spp.
	sağ	glue	-	Corynebacterium spp.

Tablo - 2 : Bakteriyojik analiz yapılan sekretuar otitis media olguları (BHI, Brain heart infusion broth).

izole edildi. Diğer olguda ise BHI besiyerinde koagülaz negatif Staphylococcus spp. izole edilirken hipertonic thiogycollate besiyerinde Corynebacterium sp. aberran formuna rastlanmıştır. Hipertonic besiyerinde 4 hastada koagülaz negatif staphylococcus, 4 hastada Corynebacterium sp. ve 1 olguda ise hem koagülaz negatif staphylococcus hem de Corynebacterium sp. aberran formu izole edilmiştir. Seröz efüzyonlu 7 kulağın üçünde sadece hipertonic thiogycollate besiyerinde aberran form tarzında üreme olmuş (ikisinde sadece koagülaz negatif Staphylococcus spp, diğerinde ise hem koagülaz negatif Staphylococcus spp. hem de Corynebacterium sp.), bir tanesinde ise BHI besiyerinde koagülaz negatif Staphylococcus spp. hipertonic besiyerinde ise koagülaz negatif Staphylococcus spp. izole edilebilmiştir. Glue efüzyonlu 11 kulağın üçünde Corynebacterium sp. birisinde koagülaz negatif Staphylococcus spp. aberran formları izole edilmiştir. BHI besiyerinde hiç üreme ile karşılaşmamıştır.

#### TARTIŞMA

Kokko (1974) % 78; Healy (1977) % 64; Karma (1986) % 65.3; Qvarberg (1990) % 67.6 negatif kültür ile karşılaşmışlardır. Karma (1986) bunun sebebinin bakteriyolojik tekniklerdeki yetersizlik olduğunu bildirmiştir (Karma ve ark. 1986).

Bugün bilinmektedir ki bakteriler başta lizozim olmak üzere çeşitli enzimlerin ve antibakteriyal ajanların (penisilin, sefalosporinler, vankomisin, cycloserin ve basitrasin) etkisi altında hücre duvarını kaybederek uygun şartlarda sferoplast, protoplast veya L-form gibi aberran bakteri formları haline geçebilmektedir (Feingold, 1969). Ayrıca spesifik antikorlar kompleman ile birlikte bakterilerde L-form oluşumuna neden olur (Lauria, 1973; Owens, 1989). Dolayısıyla antibiyotik kullanılsın veya kullanılsın özellikle kronik hastalarda mikroorganizmaların aberran formlarına rastlamak mümkündür (Belsheim, 1983; Lauria, 1969; Lauria, 1973). Bu sebeple bu çalışmada OKE'lerinde aberran formlarının varlığının gösterilmesi SOM'lı hastalarda patogeneze mikroorganizmaların aberran formlarının da rolü olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle hastalığın kronik olma özelliği ve akut atakların varlığı aberran bakteri formlarının lehinedir.

Bu çalışmanın sonuçları incelendiği zaman süperatif olmayan efüzyonlarda bulunan bakterilerin üst solunum yollarının ve cildin normal florasını

oluşturan mikroorganizmalardan meydana geldiği görülmektedir. Bizden önceki araştırmacılar başta koagülaz negatif staphylococcus olmak üzere bu bakterilerin, miringotomi işlemi sırasında orta kulaktaki efüzyonu kontamine ettiği üzerinde durmuşlardır (Bernstein, 1971). Ancak 1980 de Bernstein ve ark'ı OKE'da antikor ile kaplı staphylococcus epidermidis ve difteroidlerin varlığını ve aynı zamanda da bu ajanlara karşı orta kulakta bir immün cevabın olduğunu göstermişlerdir (Bernstein, 1980). Bu sebeple günümüzde bu mikroorganizmaların da OKE'nin patolojisinde yeri olduğu düşünülmektedir (Bernstein, 1980; Blustone, 1983). Bu çalışmada OKE örneği hipertonic besiyerinin yanısıra BHI besi yerine de ekilmiştir ve 7 vakada bu besi yerinde üreme görülmezken hipertonic besi yerinde üreme olmaktadır. Sadece 2 olguda her iki vasatta da üreme olmuştur. Bu sonuç Bernstein'in (1980) bu mikroorganizmaların da orta kulaktaki patojen ajanlardan olduğu görüşünü desteklemektedir. Bakteri duvarına etkili ve  $\beta$  - laktamaza dayanıklı antibiyotik kullanılması bu özel bakteri formlarının ortaya çıkmasında birincil etkindir (Feingold, 1969; Owens, 1989). Mikroorganizma bu şekilde antibiyotik alımına rağmen orta kulakta varlığını sürdürmekte ve kültürde de tespit edilememektedir. Sferoplast ve protoplast formlarının uygun ortam oluştuğunda tekrar patojenite kazandığı bilinmektedir (Feingold, 1969; Lauria, 1973; Sharp, 1870). Bu bilgiler ışığında klinik olarak SOM ile sık AOM atakları arasındaki yakın ilişkide bu özel bakteri formlarının ne derece rol oynadığı incelenmesi gereken önemli bir konu olarak ortaya çıkmaktadır.

#### Yazışma Adresi :

Dr. Haluk ATAÖĞLU  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Sıhhiye  
06100 ANKARA - TÜRKİYE  
Tel : 4 - 310 30 10



## KAYNAKLAR

1. Adlington P, Hooper WK : Virus studies in secretory otitis media, *J Laryngol Otol* 94 : 191-196, 1980
2. Akyıldız, N : Kulak Hastalıkları ve Mikroşirürjisi, 1 inci bası, (Ankara Ongun Matbaası). 1977, pp. 140-150
3. Belsheim MR, Darwish RZ, Watson WC, Schieven R : Bacterial L-form isolation from inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 85 : 364-369, 1983
4. Bernstein JM, Hayes ER : The middle ear mucosa in health and disease. *Arch Otolaryngol* 94 : 30-35, 1971
5. Bernstein JM, Myers D, Kosinski D, Nisengard R, Wicher K : Antibody coated bacteria in otitis media with effusions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89 (Suppl 68) : 104-109, 1980
6. Bernstein JM, Ogra PL : Mucosal immun system : Implication in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89 (Suppl 68) : 326-332, 1980
7. Bluestone CD, Klein JO : Otitis media with effusion, atelectasis, and eustachian tube dysfunction, In *Pediatric Otolaryngology*, eds CD Bluestone, S Stool, New York, Saunders Company. 1983, pp. 356-512
8. Dumas J : *Bacteriologie Medicale*. Editions medicales Ilammarion, Paris. 1969, pp. 131
9. Feingold DS : Biology and pathogenicity of microbial spheroplasts and L - forms. *N Eng J Med* 281 : 1159-1170, 1969
10. Giebink GS, Mills EL, Huff JS, Edelman CK, Weber ML, Juhn SK, Quie PG : The microbiology of serous and mucoid otitis media, *Pediatrics* 63 : 915-919, 1979
11. Giebink GS, Berzins IK, Cates KL, Huff JS, Quie PG : Polymorphonuclear leukocyte function during otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89 (Suppl 68) : 138-142, 1980
12. Healy BG, Teele DW : The microbiology of chronic middle ear effusions in children. *Laryngoscope* 87 : 1472-1478, 1977
13. Karja J : Mucociliary function in children with secretory otitis media. *Acta Otolaryngol* 95 : 544-546, 1983
14. Karma PH, Sipilä PT, Luotonen JP, Gronroos, PW : Bacteriological aspects of acute otitis media and secretory otitis media, In *Acute and Secretory otitis media*, ed J Sade, (Amsterdam, Kugler publication). 1986, pp. 181-187
15. Klein JO : Microbiology and antimicrobial treatment of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 90 : 30-36, 1981
16. Kokko, E : Chronic secretory otitis media in children : A clinical study. *Acta Otolaryngol (suppl 327)*, 1974
17. Lauria DB, Kaminiski T, Grieco M, Singer S : Aberrant forms of bacteria and fungi found in blood or cerebrospinal fluid. *Arch Intern Med* 124 : 39-48, 1969
18. Lauria DB : L-forms, spheroplasts and aberrant forms in chronic sepsis. *Adv Intern Med* 17 : 125-142, 1973
19. Lennette EH : *Manual of Clinical Microbiology* 3 rd ed, Washington DC, American Society for Microbiology. 1980, pp. 83-87
20. Owens WE : Evaluation of various antibiotics for inoculation of L-forms from *S.aureus* strains isolated from bovine mastitis. *J Clin Microbiol* 26 : 2187-2190, 1989
21. Qvamberg Y, Kantolo O, Valtonen H, Vuori E, Salo J, Toivanen M : Bacterial findings in middle ear effusion in children. *Otolaryng Head & Neck Surg* 102 : 118-121, 1990
22. Sade J : *Secretory otitis media and its sequale*, First edition (New York, Curchil Livingstone). 1979, pp. 1-11, 125-153
23. Senturia BH, Gessert CF, Carr CD, Bauman ES : Studies concerned tubatympanitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 67 : 440-467, 1958
24. Sharp JT : *The Role of Mycoplasmas and L-forms of Bacteria in Disease*. First ed, Charles C Thomas Publisher Illinois. 1970, pp. 151-171
25. Teele DW, Healy GB, Tally FP : Persistent effusions of the middle ear : Cultures for anaerobic bacteria, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89 : (Suppl 68). 1980, pp. 102-103
26. Toss M, Holm-Jensen S, Sorensen CH, Mogensen C : Spontaneous course and frequency of secretory otitis in 4- year old children. *Arch Otolaryngol* 108 : 4-10, 1982
27. Van Cauwenberg PA : The character of acute and secretory otitis media. In *Acute and Secretory Otitis media*, ed J Sade, (Amsterdam, Kugler Publication). 1986, pp. 3-12
28. Van Cauwenberg PA, Rysselaere M : Bacteria in middle ear effusions : Dead or alive. In *Acute and Secretory Otitis media*, ed. J Sade (Amsterdam, Kugler Publication). 1986, pp. 169-173