

AKUT OTİTİS MEDIA'LI ÇOCUKLARDAN ALINAN ORTA KULAK EFÜZYONU ÖRNEKLERİNDE VİRAL NÜKLEİK ASİT VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF VIRAL NUCLEIC ACIDS IN MIDDLE-EAR EFFUSION SPECIMENS FROM CHILDREN WITH ACUTE OTITIS MEDIA

Muhammed H. ABU SITTEH¹, Kenan ŞENER², Mehmet YAPAR², Abdullah KILIÇ³, Çakır GÜNEY², Ayhan KUBAR²

¹ Kral Hüseyin Tıp Merkezi, Ürdün.

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Viroloji Bilim Dalı, Ankara. (ksener@gata.edu.tr)

³ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Efüzyonlu akut otitis media, çocuklarda antibiyotik kullanımının, operasyon endikasyonunun ve işitme kaybının en önemli nedenlerinden birisidir. Olguların üçte ikisinde etken olan patojenler, bakterilerdir. Bununla birlikte, prognozda bazı etkileri olabilecek virusların etyolojik ajan olarak varlığı, artan sayıda yayın ile karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, otitis media tanısı konulan çocuklardan alınan orta kulak efüzyon (OKE) örneklerinde TaqMan "real-time" polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle respiratuvar sinsityal virusu (RSV) tip A ve B, influenza tip A virus, adenovirus, sitomegalovirus (CMV), herpes simpleks virus tip-1 (HSV-1) ve enterovirusların araştırılmasıdır. Çalışmada, 30 OKE örneğinin 18 (%60)'ünde RT-PCR yöntemiyle viral pozitiflik bulunmuş; 9 (%30) örnekte RSV-A, 3 (%10) örnekte CMV ve 1 (%3.3) örnekte HSV-1 nükleik asit varlığı saptanmıştır. Geri kalan beş örnekte ise iki farklı virus birlikte [3 (%10)'ünde adenovirus ve RSV-A; 2 (%6.7)'sinde CMV ve RSV-A] pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, çocuklarda otitis media gelişiminde virusların önemli bir rol oynadığını desteklemektedir. Ayrıca OKE örneklerinde virusların saptanmasında TaqMan RT-PCR yönteminin kısa sürede sonuç verebilen güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Akut otitis media, orta kulak efüzyonu, viral etyoloji, gerçek zamanlı PCR.

ABSTRACT

Acute otitis media with effusion (OME) is one of the major causes of antibiotic use, indication for operation and hearing loss in children. In two third of the cases the etiologic agents are bacteria. Nonetheless, increasing numbers of reports have implicated viruses as etiologic agents that may have some effect on prognosis of OME. The aim of this study was to investigate the presence of nucleic acids of respiratory syncytial virus (RSV) type A and B, influenza type A virus, adenovirus, cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus type-1 (HSV-1), and enteroviruses in the middle ear effusion specimens from

children with otitis media by TaqMan real-time PCR. As a result, 18 of 30 (60%) OME samples were found positive in terms of viral nucleic acids by real-time PCR. RSV-A was detected in nine samples (30%), CMV in 3 (10%) samples and HSV-1 in 1 (3.3%) sample. In five of the samples two viruses were detected in the same sample (three were positive for adenovirus and RSV-A, and two were positive for CMV and RSV-A). Our data have supported the importance of viruses as etiologic agents of OME. Additionally, it was thought that TaqMan real-time PCR may be used as a reliable and rapid method for the detection of viruses in the middle ear effusion samples.

Key words: Acute otitis media, middle ear effusion, viral etiology, real-time PCR.

GİRİŞ

Akut otitis media (AOM), tüm dünyada çocukluk çağıının en önemli sağlık sorunlarından biridir¹⁻⁴. Gelişmekte olan ülkelerde AOM, çocukların antibiyotik tüketiminin veya ameliyat olmasının en sık karşılaşılan nedenlerindendir^{1,4,5}. Amerika Birleşik Devletleri'nde AOM enfeksiyonlarına bağlı yıllık harcama tutarının yaklaşık olarak 3-5 milyar dolar olduğu bildirilmektedir^{1,4}. Yapılan bir çalışmaya göre, doktor muayenelerinin %33'ünün ve beş yaşından küçük çocukların %40'ının antibiyotik kullanımının nedeni otitis media olarak bulunmuştur⁶.

AOM, çocuklarda respiratuvar sinsityal virus (RSV), influenza virus, parainfluenza virus ve enterovirusların neden olduğu üst solunum yolu enfeksiyonlarının en önemli komplikasyonlarından biridir⁷. Heikkinen ve arkadaşları⁶, AOM gelişen çocukların yaklaşık %20'sine yukarıda sayılan virusların neden olduğunu göstermiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), viral enfeksiyon etkenlerinin tanısı için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir^{8,9}. Günümüzde birçok farklı PCR tekniği tanı amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan gerçek zamanlı PCR ile, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek sonuçlar elde edilmektedir¹⁰. Bu yöntem aynı zamanda amplifikasyon ürününün miktarını da ölçebilmektedir. Bu şekilde özellikle viral enfeksiyonların evreleri tanımlanmakta ve tedavi etkinliği izlenebilmektedir¹¹⁻¹⁴.

Bu çalışmanın amacı, otitis media tanısı konmuş hastaların orta kulak efüzyonlarında, influenza virus tip A, RSV tip A ve B, adenovirus (AdV), herpes simpleks virus (HSV) tip 1, sitomegalovirus (CMV) ve enterovirus varlığının TaqMan "real-time" PCR yöntemiyle araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Popülasyonu ve Örnekler

Çalışmaya, Kasım 2002-Eylül 2003 tarihleri arasında efüzyonlu otitis media tanısı konulan çocuk yaş grubundaki (15 erkek, 15 kız; yaş aralığı: 3-14 yıl; yaş ortalaması: 6.8 yıl) hastalar alındı. Orta kulak efüzyonu (OKE) örnekleri genel anestezi altında dış kulak yolu povidon-iyot (betadine) ile silindikten sonra mikroskop eşliğinde miringotomi (kulak zarı kesilmesi) yöntemi ile steril tüplere aspire edilerek alındı ve en kısa sürede GATA Viroloji Bilim Dalı laboratuvarlarına ulaştırıldı. Örnekler çalışmaya alınincaya kadar -80°C'de saklandı.

Çalışmada CMV, HSV-1, adenovirus, RSV tip A ve B, influenza virus tip A ve enteroviruslara ait laboratuvarıda izole edilen suşlar ile klonlanmış PCR ürünleri kontrol olarak kullanıldı.

Klinik Örneklerden Nükleik Asit İzolasyonu

DNA izolasyonu, alkali fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemine göre yapıldı¹⁵. DNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı. RNA izolasyonu 200 µL örnekten EZ-RNA total RNA izolasyon kiti (Biologic Industries, Beit Haemek, İsrail) kullanılarak üretici firmasının önerileri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen RNA pelleti 40 µL "RNase-free" steril distile suda (Sigma/Almanya) süspanse edildi. RNA'lar revers transkripsiyon aşamasına kadar -80°C'de saklandı.

Primer ve Prob Dizaynı

Çalışmada kullanılan tüm primer ve problemlerin dizaynı OligoYap 3.0 isimli bilgisayar yazılımı yardımıyla yapıldı¹⁶. Tüm oligolar MWG-Biotech (Almanya) firmasına sentezlettirildi (Tablo I). Sentezlenen primerlerin duyarlılıklarını belirlemek amacıyla; CMV ve HSV için daha önce rutin laboratuvarımıza gelen örneklerden elde edilen DNA'lar, adenovirus, enterovirus ve influenza için laboratuvarımızdaki kültür koleksiyonundan elde edilen DNA'lar pozitif kontrol olarak kullanıldı. Primerlerin özgüllükleri ise restriksiyon enzim kesimiyle belirlendi.

PCR İşlemi

Son hacmi 40 µL olan ve içerisinde 2 mM dNTP (Sigma/Almanya), 1x PCR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 U Taq DNA polimeraz ve 20 pmol sens ve antisens primerler olan reaksiyon karışımına 10 µL DNA ilave edildikten sonra "thermal cycler" cihazında

Tablo I. Gerçek Zamanlı PCR Yönteminde Kullanılan Primer* ve Problar**

Virus	Sens primerler	Antisens primerler	Problar
CMV	5'-acaggttgagccc-ggcggtggt-3'	5'-ctggagctcacccgacagacacc-3'	5'-FAM cgagagaagcgccacatacagcgcaaacacc TAMRA-3'
HSV-1	5'-ccggccgtgtgacacta-3'	5'-atgaccgaac-aactccctaa-3'	5'-JOE ataccgacca-caccgacgaatc TAMRA-3'
Adenovirus	5'-tcgatgMtgcc-ScaRtggKcDtac-3'	5'-gccacNgtggg-RttYctraactgtt-3'	5'-JOE cacatckscggvca-ggacgcytcggagta TAMRA-3'
RSV-A	5'-gctcttagcaaa-gtcaagt-3'	5'-tgctccgttgatgtgtatt-3'	5'-FAM aactcaacaaagat-caactctgtcatc TAMRA-3'
RSV-B	5'- gatggctcttagcaaa-gtcaagtaa-3'	5'-tgtcaatattatct-cctgtactacgttgaa-3'	5'-JOE tgatacattaaataagg-atcagctgtgtcat TAMRA-3'
Enterovirus	5'-ccctgaatgcgg-ctaacc-3'	5'-attgtcaccataag-cagcca-3'	5'-FAM aaccgactac-ttggtgtccgtgtttc TAMRA-3'
Influenza-A	5'-cgatcttcgccaatt-caca-3'	5'-ccatgagWgc-YtcRagat-3'	5'-FAM acggttctctc-YatcgtYccgtca TAMRA-3'

* H, K, R, S ve Y dejeneratif bazları göstermektedir (Wobble bazlar): M= A/C, K= G/T, R= A/G, S= G/C, Y= C/T, N= Herhangi biri, D= A/G/T, V= A/C/G.

** JOE, FAM ve TAMRA proba ait floresan işaretlerdir.

94°C'de beş dakika, daha sonra her bir siklus 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye, 72°C'de 35 saniye olmak üzere 40 siklus ve en son uzatma aşaması için 72°C'de 10 dakika olacak şekilde PCR işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ürünün 5 µL'si jel elektroforezde (%1.5 agaroz, 1x TBE, 100V) 100 bazçiftlik (bp) moleküler standart (K180-250 UL, Amresco, USA) kullanılarak yürütüldü. Jel etidyum bromür ile boyandı ve UV (Gel Doc 2000, BIO-RAD, USA) kullanılarak görüntüledi.

Klonlama ve Standartların Hazırlanması

Jelde görüntülenen amplifikasyon ürünlerinden uygun olanları bistüri ile kesilerek alındı. Kesilen jel parçacıkları ticari jel ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) ile pürifiye edildi. Pürifiye PCR amplifikasyon ürünleri "TA cloning kit" (Invitrogen, Almanya) kullanılarak pCR 2.1 plazmidine klonlandı. Transformasyon işlemi *Escherichia coli*'ye kimyasal yolla yapıldı. Bakterilerden plazmid pürifikasyonu "plasmid purification kit" (Invitex, Almanya) kullanılarak yapıldı ve spektrofotometri ile DNA miktarı ölçülüp, OligoYap 3.0 yardımı ile kantitasyon standartları hazırlandı.

Revers Transkripsiyon

cDNA sentezi, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM dithiothreitol (DTT), 3 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 40 U revers transkriptaz (Promega, Madison), 20 pmol antisens primer içeren 20 µl'lik reaksiyon karışımına 5 µL RNA süspansiyonundan ilave edilerek yapıldı. Karışım 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnaktivasyon için 95°C'de beş dakika bekletildi. Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PCR işlemine alındı.

Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

TaqMan RT-PCR yönteminde son hacmi 25 µL olan ve içerisinde 5 µL klinik örneklerden izole edilen DNA (veya cDNA), 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5'er pmol sens, antisens primer ve 4 pmol TaqMan probu bulunan reaksiyon karışımı kullanıldı. PCR siklusları 50°C'de iki dakika, 95°C'de on dakika [hotStart Taq DNA polimeraz (AmpliTaq Gold-DNA polymerase, Applied Biosystems, ABD) aktivasyonu için] daha sonra 40 siklus 95°C'de 15 saniye, 60°C'de bir dakika olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyon, verilerin elde edilmesi ve tüm analizler ABI PRISM 7700 Sequence Detector cihazı (Applied Biosystems, ABD) ile yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 30 OKE örneğinin 18 (%60)'inde RT-PCR yöntemiyle viral pozitiflik saptanmıştır. Örneklerin 9 (%30)'unda RSV-A, 3 (%10)'ünde CMV, 1 (%3.3)'inde HSV-1 saptanmış, beş örnekte ise iki farklı tip virus birlikte pozitif bulunmuştur. Bu beş örnekten üçünde adenovirus ve RSV-A, ikisinde de CMV ve RSV-A'nın birlikte pozitif olduğu izlenmiştir.

TARTIŞMA

AOM, çocukluk yaş grubunda en sık görülen ve antibiyotik tedavisi gerektiren hastalıklardan biridir. Tekrarlayan AOM, antibiyotiğe dirençli bakteriler tarafından oluşturul-

maktadır¹⁹. Bununla birlikte son zamanlarda yenidoğan ve küçük çocuklarda üst solunum yolu viral enfeksiyonları ile AOM arasındaki ilişki açık bir şekilde ortaya konulmuştur^{1,8,18-20}. AOM olan çocukların OKE örneklerinde virusların araştırılması, bu hastalığın nedenleri arasında virusların rolünü göstermek açısından önemlidir⁶. En sık izole edilen viruslar RSV, influenza viruslar, adenovirus, parainfluenza viruslar ve enteroviruslardır^{1,6,19,20}. CMV ve HSV de etken olarak izole edilen viruslar arasında yer alır^{17,21}.

Yapılan bir çalışmada, AOM tanısı konulan 271 çocuğun 66'sında viral antijen veya virus varlığı saptanmış; etkenler sıklık sırasına göre RSV (%55), parainfluenza virus (%13.2), CMV (%13.2), enterovirus (%1.47) ve rinovirus (%1.47) olarak bulunmuştur²². Heikkinen ve arkadaşlarının¹ çalışmasında, AOM tanısı konulan 456 çocuktan alınan OKE örneklerinde RSV (%74), diğer viruslardan daha sık olarak izole edilmiştir. Aynı çalışmada parainfluenza virus %52, influenza virus %42, enteroviruslar %11 ve adenoviruslar %5.4 oranında bulunmuştur¹. Bir başka çalışmada Monobe ve arkadaşları¹⁹, 93 OKE örneğinde RT-PCR ile dokuz farklı solunum yolu virusunu araştırmışlar ve 39 (%42) örnekte pozitiflik bulmuşlardır. Bunların %69'unun RSV, %19'unun adenovirus, %7.1'inin rinovirus ve %4.8'inin influenza virus olduğu bildirilmiştir¹⁹. Multiplex PCR yönteminin kullanıldığı bir çalışmada ise, 73 OKE örneğinden 51 (%69.8)'inde viral pozitiflik saptanmış; bunların 35 (%47.9)'inde solunum yolu virusları (RSV-A, adenovirus, rinovirus, RSV-B, influenza virus), 16 (%21.9)'sında ise herpesviruslar (CMV ve HSV) pozitif olarak bulunmuştur¹⁷. Yine bir başka çalışmada, 940 AOM'li çocuğun nazofarengeal aspiratları ve OKE örneklerinden RT-PCR ile rinovirus, enterovirus ve parainfluenza virus, antijen arama yöntemiyle de diğer yaygın solunum yolu virusları araştırılmış ve sonuçta incelenen tüm AOM olgularının 2/3'ünde nazofarengeal veya OKE örneğinden birinde virus varlığı saptanmıştır²⁰.

Bizim çalışmamızda da, diğer çalışmalarla uyumlu olarak solunum yolu virusları daha yüksek oranda bulunmuştur. Pozitif bulunan 18 örnekte beşinde iki etken birlikte bulunmak üzere toplam 23 etkenden 14'ü RSV-A, üçü de adenovirus olarak saptanmıştır. Bir başka ifadeyle, saptanan virusların yaklaşık %74 (17/23)'ü solunum yolu viruslarıdır. Geri kalan etkenler herpes grubu viruslar olup, bunlardan 4 (%17.4)'ü tek başına (üç CMV ve bir HSV), 2 (%8.7)'si ise RSV-A ile birlikte (CMV + RSV) saptanmıştır. RSV, çocuklarda AOM için en muhtemel predispozisyon faktörüdür. Sonuçlarımızın, çocuklarda AOM gelişiminde RSV'nin önemli bir etken olduğu görüşünü desteklediği düşünülmüştür. AOM gelişimi çoklu faktörlere bağlı bir süreç olduğundan, farklı virusların AOM oluşumunu kolaylaştırma potansiyellerini belirlemek zordur. Bununla birlikte bu çalışmada, tek başına etken olan herpesvirusların oranı (%17.4), herpes grubu virusların da otitis media patogeneğinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak bu verilerin daha büyük hasta popülasyonu ile çalışılarak desteklenmesi gerekmektedir.

Konvansiyonel metotlarla karşılaştırıldığında, PCR yönteminin duyarlılığının yüksek olduğu bildirilmektedir. Altmış beş OKE örneği ile yapılan bir çalışmada kültür ile multiplex PCR yöntemleri karşılaştırılmış, kültürle %29 olarak bulunan pozitiflik oranının PCR yöntemiyle %72'ye çıktığı ve kültür negatif örneklerin üçte ikisinde PCR ile bir etken izo-

le edildiği bildirilmiştir⁸. Çalışmamızda kullanılan TaqMan yöntemi, PCR temelli olmakla birlikte, analiz açısından floresan rezonans enerji transferi tekniğini kullanması nedeniyle test duyarlılığı daha yüksektir. Ayrıca bu yöntem özgüllüğü yüksek, güvenilir ve hızlı bir metot olup, dört-beş saat içinde tıbbi tanı ve kantitasyon yapabilmektedir. Diğer klasik yöntem ve PCR teknikleriyle karşılaştırıldığında bazı ciddi avantajlara sahiptir. Amplifikasyon sonrası basamakların olmaması nedeniyle tek bir çalışma yapılarak para ve zamandan büyük tasarruf sağlanmaktadır. Ayrıca, örnekler içinde kontaminasyon riski de oldukça düşüktür. Doksan altı kuyucuklu çalışma zemini de büyük çaplı çalışmaların yapılmasını sağlamaktadır.

Çocuklarda sık görülen AOM etyolojisinde genellikle bakteriler etken olarak görülmekte ve sıklıkla tedavide antibiyotikler kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, bakteri ve/veya virusların olguların %96'sında, bakteri ve virus birlikteliğinin ise olguların %66'sında saptandığı bildirilmiştir²³. Görüldüğü üzere AOM, sadece bakteriler tarafından oluşturulan bir enfeksiyon olmayıp, etyolojide virusların da rolü büyüktür. Burada viral etkenlerin saptanmasında kullanılacak yöntemin duyarlı bir yöntem olması oldukça önem arz etmektedir. Sonuç olarak, AOM patolojisinde suçlanan ve muhtemel viral etkenlerle ilgili yapılacak çalışmalarda, TaqMan teknolojisinin kullanılması, özellikle kantitatif değerler elde edilmesi nedeniyle etyopatogenezi aydınlatmada yararlı bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Heikkinen T, Thint M, Chonmaitree T. Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *N Engl J Med* 1999; 340: 260-4.
2. Froom J, Culpepper L, Grob P, et al. Diagnosis and antibiotic treatment of acute otitis media: report from international primary care network. *Br Med J* 1990; 300: 582-6.
3. Heikkinen T, Chonmaitree T, Thint M. Respiratory viruses and acute otitis media. *N Engl J Med* 1999; 340: 2002-6.
4. Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis GA, Rosenfeld RM. Otitis media. *Lancet* 2004; 363: 465-73.
5. Babin E, Lemarchand V, Moreau S, Goulet de Rugy M, Valdazo A, Bequignon A. Failure of antibiotic therapy in acute otitis media. *J Laryngol Otolaryngol* 2003; 117: 173-6.
6. Heikkinen T, Chonmaitree T. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. *Clin Microbiol Rev* 2003;16: 230-41.
7. Sagai S, Suetake M, Yano H, et al. Relationship between respiratory syncytial virus infection and acute otitis media in children. *Auris Nasus Larynx* 2004; 31: 341-5.
8. Chonmaitree T, Henrickson KJ. Detection of respiratory viruses in the middle ear fluids of children with acute otitis media by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 258-60.
9. Raty R, Kleomola M, Melen K, Stenvik M, Julkunen I. Efficacy of PCR and other diagnostic materials for the detection of respiratory adenoviral infections. *J Med Virol* 1999; 59: 66-72.
10. Borg RG, Löseke S, Bittscheidt J, Schultze-Werninghaus G, Stephan V, Bufe A. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *Eur Respir J* 2003; 21: 944-51.
11. Locatelli G, Santoro F, Veglia F, Gobbi A, Lusso P, Maluti MS. Real-time quantitative PCR for human herpes-viruses 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4042-8.

12. Guiver M, Fox AJ, Mutton K, Mogulkoc N, Egan J. Evaluation of CMV viral load using Taqman CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients. *Transplant* 2001; 71: 1609-15.
13. Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicoolas JC, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real- time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1404-8.
14. Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang ML, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000; 32: 626-9.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, Book 3, Appendices B16*. 1998, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
16. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one step real-time reverse transcriptase PCR. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 358-62.
17. Shinogami M, Ishibashi T. Presence of human herpesviruses in young children with acute otitis media. *Intern J Pediatr Otorhinolaryng* 2004; 68: 205-10.
18. Koivunen P, Kontiokari T, Niemela M, Pokka T, Uhari M. Time to development of acute otitis media during an upper respiratory tract infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 303-5.
19. Monobe H, Ishibashi T, Nomura Y, Shinogami M, Yano J. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. *Intern J Pediatr Otorhinolaryng* 2003; 67: 801-6.
20. Nokso-Koivisto J, Ray R, Blomqvist S, et al. Presence of specific viruses in the middle ear fluids and respiratory secretions of young children with acute otitis media. *J Med Virol* 2004; 72: 241-8.
21. Chonmaitree T, Owen MJ, Patel JA, Hedgpeth D, Horlick D, Howie VM. Presence of cytomegalovirus and herpes simplex virus in middle ear fluids from children with acute otitis media. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 650-3.
22. Chonmaitree T, Owen MJ, Patel JA, Hedgpeth D, Horlick D, Howie VM. Effect of viral respiratory tract infection on outcome of acute otitis media. *J Pediatr* 1992; 120: 856-62.
23. Chonmaitree T. Acute otitis media is not a pure bacterial disease. *Clin Infect Dis* 2006; 43:1423-5.