



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RITA GOMES E ALVELOS

***Microbiologia da Otite Média Aguda com Otorreia em
Crianças em Idade Pré-escolar na Era das Vacinas Conjugadas
Pneumocócicas***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA FERNANDA MARIA PEREIRA RODRIGUES

DOUTORA ANA SOFIA SIMÕES

ABRIL/2019

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE
MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM
MEDICINA

**MICROBIOLOGIA DA OTITE MÉDIA AGUDA COM OTORREIA EM CRIANÇAS EM
IDADE PRÉ-ESCOLAR NA ERA DAS VACINAS CONJUGADAS PNEUMOCÓCICAS**

Rita Gomes e Alvelos¹

Ana Sofia Simões², Begonia Morales-Aza³, Adam Finn³

Fernanda Rodrigues^{1,2}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

²Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

³School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, United Kingdom

Morada institucional do orientador: Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de
Coimbra – Avenida Afonso Romão, 3000-602 COIMBRA

Endereço eletrónico: rodriguesfmp@gmail.com

Abril de 2019

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------|-----|
| RESUMO | iii |
| PALAVRAS-CHAVE | iii |
| ABSTRACT | iv |
| KEYWORDS | iv |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | v |
| LISTA DE TABELAS | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vii |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 3 |
| RESULTADOS..... | 5 |
| DISCUSSÃO | 13 |
| CONCLUSÃO | 18 |
| AGRADECIMENTOS | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |

RESUMO

Introdução e objetivos: A otite média aguda (OMA) é uma infecção muito comum em idade pediátrica, sendo precedida por colonização bacteriana da nasofaringe (NF). Algumas crianças têm infecções recorrentes, nas quais podem estar envolvidos diferentes microrganismos ou combinações dos mesmos, bem como a formação de biofilmes. Uma das formas de estudar a etiologia da OMA é através da timpanocentese, procedimento não utilizado por rotina em Portugal. A otorreia pode complicar a OMA (OMA com otorreia, OMAO), permitindo um acesso mais fácil à amostra biológica. O objetivo deste estudo foi analisar a etiologia da OMA e da OMA recorrente (OMAR) na era das vacinas conjugadas pneumocócicas e avaliar se a presença de várias espécies bacterianas é mais comum em crianças com OMAR.

Materiais e métodos: Entre dezembro de 2013 e abril de 2016, foram colhidas simultaneamente secreções nasofaríngeas e otorreia de crianças em idade pré-escolar com diagnóstico de OMA, com otorreia com duração inferior a 3 dias e presença de febre e/ou irritabilidade e/ou otalgia. OMAR foi definida como 3 ou mais episódios de OMA nos últimos 6 meses ou 4 ou mais no último ano. Após extração de DNA, as amostras foram submetidas a qPCR de gene único para *Streptococcus pneumoniae* (Sp) (*lytA*), *Haemophilus influenzae* (Hi) (*hdp*), *Moraxella catarrhalis* (Mc) (*ompJ*), *Staphylococcus aureus* (Sa) (*nuc*) e *Streptococcus* do grupo A (SGA) (*ntpC*).

Resultados: Das 151 crianças incluídas no estudo, 85 (56%) eram rapazes e a idade média era de 31 meses (2-81). Sp foi detetado em 71 (47%) casos, Hi em 82 (54%), Mc em 45 (30%), Sa em 32 (21%) e SGA em 37 (25%). Verificou-se uma maior probabilidade de detetar Sp ($p=0,024$) e Hi ($p=0,007$) na otorreia das crianças com OMAR, relativamente às crianças com OMA. Das 27 crianças com OMAR, 23 (85%) tinham 2 ou mais bactérias presentes na otorreia; das 124 sem OMAR, 64 (52%) tinham 2 ou mais bactérias ($p=0,001$).

Conclusões: As bactérias mais frequentemente detetadas na otorreia foram Hi e Sp. Crianças com OMAR tinham com maior frequência múltiplas espécies bacterianas, o que pode, em parte, explicar a maior dificuldade de tratamento e a menor efetividade das vacinas pneumocócicas conjugadas nessas crianças.

PALAVRAS-CHAVE: otite média aguda; otite média aguda recorrente; otorreia; microbiologia.

ABSTRACT

Introduction and aims: Acute otitis media (AOM) is one of the most frequent infections in the paediatric age and is preceded by nasopharyngeal (NP) bacterial colonisation. Some children suffer from recurrent infections, which might involve different bacterial species or combinations of them, as well as biofilm formation. One way of assessing its etiology is by tympanocentesis, a procedure not routinely performed in Portugal. AOM may be complicated by otorrhea (acute otitis media with otorrhea, AOMO), allowing an easier access to biological samples. The aim of this study was to analyse the aetiology of AOM and recurrent AOM (RAOM) in the pneumococcal conjugate vaccines era and evaluate if the presence of several bacterial species was more common in children with RAOM.

Material and methods: From December 2013 to April 2016, NP and otorrhea samples were simultaneously collected from preschool-aged children with AOM with otorrhea lasting less than 3 days and presence of fever and/or irritability and/or otalgia. RAOM was defined as 3 or more episodes of AOM in the last 6 months or 4 or more in the past year. After DNA extraction, the samples were subjected to single gene qPCR for *Streptococcus pneumoniae* (Sp) (lytA), *Haemophilus influenzae* (Hi) (hdp), *Moraxella catarrhalis* (Mc) (ompJ), *Staphylococcus aureus* (Sa) (nuc) and Group A *Streptococcus* (GAS) (ntpC).

Results: Of the 151 children included in the study, 85 (56%) were male and the mean age was 31 months (2-81). Sp was detected in 71 (47%) samples, Hi in 82 (54%), Mc in 45 (30%), Sa in 32 (21%) and GAS in 37 (25%). There was a higher probability of finding Sp ($p=0.024$) and Hi ($p=0.007$) in the otorrhea of children with RAOM, compared to children with AOM. Of the 27 children with RAOM, 23 (85%) had 2 or more bacteria present in the otorrhea; of the 124 children without RAOM, 64 (52%) had ≥ 2 bacteria ($p=0.001$).

Conclusion: The bacteria most frequently detected in otorrhea were Hi and Sp. Children with RAOM had more often multiple bacterial species, which might, in part, explain the difficulties in treating these infections and contribute for the lower effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines in these children.

KEYWORDS: acute otitis media; recurrent acute otitis media; otorrhea; microbiology.

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – Percentagem de identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia e na nasofaringe. | 6 |
| Gráfico 2 – Bactérias presentes na otorreia e simultaneamente na nasofaringe..... | 6 |
| Gráfico 3 – Frequência de identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia das crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR)..... | 9 |
| Gráfico 4 – Frequência de identificação das diferentes espécies bacterianas nas secreções nasofaríngeas das crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR)..... | 9 |
| Gráfico 5 – Presença de múltiplas espécies bacterianas na otorreia de crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR). | 10 |
| Gráfico 6 – Presença de múltiplas espécies bacterianas na nasofaringe (NF) de crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR)..... | 11 |
| Gráfico 7 – Presença de <i>Streptococcus pneumoniae</i> na otorreia e nas secreções da nasofaringe (NF) das crianças vacinadas com pelo menos uma dose de vacina conjugada pneumocócica (vacinadas) e não vacinadas. | 12 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela I – Identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções nasofaríngeas. | 5 |
| Tabela II – Dados demográficos e clínicos das crianças com otite média aguda (OMA) e com otite média aguda recorrente (OMAR)..... | 7 |
| Tabela III – Detecção das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções da nasofaringe (NF) em cada um dos grupos com otite média aguda (OMA) e com otite média aguda recorrente (OMAR). | 8 |
| Tabela IV – Frequência de detecção das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções da nasofaringe (NF) das crianças vacinadas com vacina conjugada pneumocócica e não vacinadas. | 11 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| Hi | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| Mc | <i>Moraxella catarrhalis</i> |
| NF | Nasofaringe |
| OMA | Otite média aguda |
| OMAO | Otite média aguda com otorreia |
| OMAR | Otite média aguda recorrente |
| PNV | Programa Nacional de Vacinação |
| qPCR | Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real |
| Sa | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SGA | <i>Streptococcus</i> do grupo A |
| Sp | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| STGG | Skim-milk tryptone glucose glycerol |

INTRODUÇÃO

A otite média aguda (OMA) é uma inflamação supurativa aguda do ouvido médio com sintomas e sinais locais, como otalgia e otorreia, e sinais sistémicos, como febre, irritabilidade, anorexia, e, por vezes, vómitos e/ou diarreia [1]. A sua severidade pode variar desde a forma não complicada, que é a mais frequente, até formas complexas, que incluem infeções recorrentes [2, 3]. A OMA recorrente (OMAR) caracteriza-se por episódios repetidos de OMA [1].

É uma infeção muito comum na idade pediátrica, sendo uma das mais frequentes nesta faixa etária [4]. Cerca de 60% das crianças têm um ou mais episódios de OMA até aos 3 anos de idade, com 11% a sofrerem de OMAR [5]. Nos países desenvolvidos, é a causa mais frequente de ida a serviços de saúde pediátricos, bem como de prescrição antibiótica [6]. Atinge frequentemente crianças em idade pré-escolar, com 51% dos casos a ocorrer abaixo dos 5 anos [4], com uma mediana entre os 20 e os 36 meses [7-10]. Idades mais precoces à data do diagnóstico do primeiro episódio de OMA parecem associar-se a maior número de episódios futuros [5].

A OMA bacteriana é causada por agentes patogénicos presentes nas vias aéreas superiores. A colonização da nasofaringe (NF) precede a doença, sendo o ponto de partida para a infeção [3, 11, 12]. A percentagem de crianças em idade pré-escolar que está colonizada por *Streptococcus pneumoniae* (Sp), *Haemophilus influenzae* (Hi) não tipável e *Moraxella catarrhalis* (Mc) é muito elevada [3, 11, 13, 14].

As bactérias mais frequentemente envolvidas na OMA são Sp (25-50%) e Hi não tipável (15-30%) [3, 15-21]. Seguem-se Mc (3-20%) [16, 17] e *Streptococcus* do grupo A (SGA) (2-10%) [15, 17, 19-21]. Mais raramente, podem estar presentes outros agentes, tal como *Staphylococcus aureus* (Sa) (1-3%) [16, 19-21].

Atualmente, estão comercializadas duas vacinas conjugadas contra Sp, que incluem antígenos capsulares de 10 (Synflorix[®], GSK) ou de 13 (Prevenar13[®], Pfizer) serotipos, os mais frequentemente isolados em doença invasiva pneumocócica [13]. Em Portugal, a vacina conjugada de 13 valências integra, desde 2015, o Programa Nacional de Vacinação (PNV). A primeira vacina conjugada pneumocócica começou a ser comercializada e utilizada em Portugal em 2001, havendo uma cobertura vacinal elevada prévia à integração no PNV [22].

Com a implementação da vacinação universal, verificou-se uma redução da colonização nasofaríngea por serotipos vacinais [13, 23-25], explicando a redução na incidência de OMA e de OMA causada por Sp [17, 26, 27]. Verificou-se, também, uma diminuição na procura de

cuidados médicos devidos a OMA [7]. A vacinação reduziu, ainda, o risco de OMA complexas, ao diminuir a frequência de OMA em idades precoces [13].

Simultaneamente, ocorreu substituição por serotipos não vacinais [23, 25, 26], que parecem, no entanto, ter menor virulência [3, 18].

Alguns estudos descrevem também um aumento relativo da identificação de Hi na OMA [15, 16, 28], tornando-se, em algumas condições, o agente dominante [16, 28].

Na OMAR, Hi é o microrganismo mais frequentemente isolado, o que pode indicar uma associação entre este agente e as OMA complicadas [3, 5, 29, 30].

A timpanocentese constitui uma das formas de estudar a etiologia da OMA, mas, em Portugal, este procedimento não é utilizado por rotina. No entanto, a OMA pode complicar-se com perfuração timpânica espontânea e otorreia (OMA com otorreia, OMAO), o que permite um acesso mais fácil a amostras biológicas.

Pretende-se com este estudo analisar os agentes microbiológicos responsáveis pela OMA e OMAR, em crianças em idade pré-escolar, na era das vacinas conjugadas pneumocócicas, avaliando a microbiologia da colonização nasofaríngea e da otorreia. Pretende-se ainda analisar se a presença simultânea de várias espécies bacterianas é mais comum na OMAR, quando comparada com crianças com OMA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tratou-se de um estudo prospetivo, observacional, que decorreu no Serviço de Urgência do Hospital Pediátrico – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de dezembro de 2013 a abril de 2016 (29 meses).

Incluiu crianças em idade pré-escolar, cujos pais aceitaram a participação no estudo, com o diagnóstico de OMA com otorreia, definida como a presença de otorreia com menos de 3 dias de duração e de pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: febre e/ou irritabilidade e/ou otalgia. O limite de 3 dias foi utilizado em estudos semelhantes efetuados previamente, para reduzir o risco de encontrar contaminantes da pele ou do ouvido externo na otorreia [31, 32].

OMAR foi definida como a existência de diagnóstico médico de 3 ou mais episódios de OMA nos últimos 6 meses ou 4 ou mais no último ano.

Foram recolhidos dados clínicos e demográficos.

Não foi efetuada limpeza prévia do canal auditivo nem aspiração antes da obtenção do material biológico. As zaragatoas nasofaríngeas e da otorreia foram colhidas simultaneamente e colocadas em meio de transporte e armazenamento (skim-milk tryptone glucose glycerol (STGG), Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) e guardadas a -80°C, até análise microbiológica. Posteriormente, foi feita extração de DNA com o *QIAasymphony SP instrument* (Qiagen, Manchester, UK), utilizando o *QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit* (937036, Qiagen, Manchester, UK). Foi utilizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) de gene único para Sp (lytA), Hi (hdp), Mc (ompJ), Sa (nuc) e SGA (ntpC). Considerou-se amostra positiva quando a deteção ocorreu com um limiar de ciclo (*Ct*) inferior a 36 ciclos. Não foram analisados microrganismos menos frequentemente causadores de OMA, nos quais se incluem *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Alloicoccus otiditis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* [16, 19-21].

A análise estatística foi efetuada utilizando o programa IBM® SPSS® *Statistics*, versão 20. Foi realizada a análise descritiva das frequências das variáveis demográficas e clínicas e da identificação das diferentes espécies na otorreia e nas secreções nasofaríngeas. A associação entre a identificação das espécies numa e noutra amostra biológica foi analisada com recurso ao teste de Qui-quadrado ou ao teste exato de Fisher, quando pelo menos uma das células tivesse um valor esperado inferior a 5. Relativamente aos dados demográficos dos grupos de crianças com OMA e OMAR, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para uma amostra, por forma a verificar se a idade média seguia uma distribuição normal em

cada um dos grupos e, em seguida, o teste U de Mann-Whitney para atestar diferenças entre os dois grupos. O sexo, vacinação com vacina conjugada pneumocócica, frequência de infantário, toma de antibiótico no mês precedente ou à data da colheita, presença de febre e presença de otalgia ou irritabilidade, foram avaliadas com o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, nos mesmos moldes acima descritos. Da mesma forma, foram avaliadas a distribuição e número de bactérias presentes na otorreia e na NF nos dois grupos, bem como a distribuição de bactérias no grupo de crianças vacinadas e não vacinadas. Consideraram-se como estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Foi obtido consentimento informado escrito por parte dos pais das crianças que participaram no estudo.

RESULTADOS

Foram incluídas no estudo 151 crianças, das quais 85 (56%) eram rapazes. A idade média foi de 31 meses (2-81 meses).

Cento e vinte e oito (85%) crianças tinham recebido a vacina conjugada pneumocócica e o mesmo número frequentava o infantário.

Oitenta e sete (58%) crianças tinham febre e 131 (87%) tinham otalgia ou irritabilidade. Dadas as premissas do estudo, todas as crianças se apresentavam com otorreia espontânea.

Oito (5%) crianças estavam sob terapêutica com antibiótico à data da colheita das amostras biológicas e 29 (19%) tinham realizado antibiótico no mês precedente.

Os diferentes agentes microbiológicos identificados na otorreia e nas secreções nasofaríngeas são apresentados e comparados na Tabela I, observando-se que Sp, Hi e Mc são mais frequentemente detetados na NF e Sa e SGA na otorreia. Devido a coinfeção e cocolonização, em algumas amostras identificou-se mais do que um microrganismo, razão pela qual o total de deteções é superior ao número total de amostras (151|100%).

Tabela I – Identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções nasofaríngeas.

| Espécie | Otorreia nº (%) | Nasofaringe nº (%) | p | OR | IC a 95% |
|------------|--------------------|-----------------------|---------|--------|----------------|
| Sp | 71 (47%) | 98 (65%) | <0,001* | 5,169 | 2,418-11,051 |
| Hi | 82 (54%) | 101 (67%) | <0,001* | 7,151 | 3,296-15,515 |
| Mc | 45 (30%) | 99 (66%) | <0,001* | 6,373 | 2,331-17,420 |
| Sa | 32 (21%) | 15 (10%) | 0,001** | 7,370 | 2,390-22,725 |
| SGA | 37 (25%) | 32 (21%) | <0,001* | 58,860 | 18,577-186,494 |

*Teste Qui-quadrado ** Teste exato de Fisher

Para maior facilidade de visualização, as percentagens de identificação das diferentes bactérias nos dois produtos biológicos são também apresentadas no Gráfico 1.

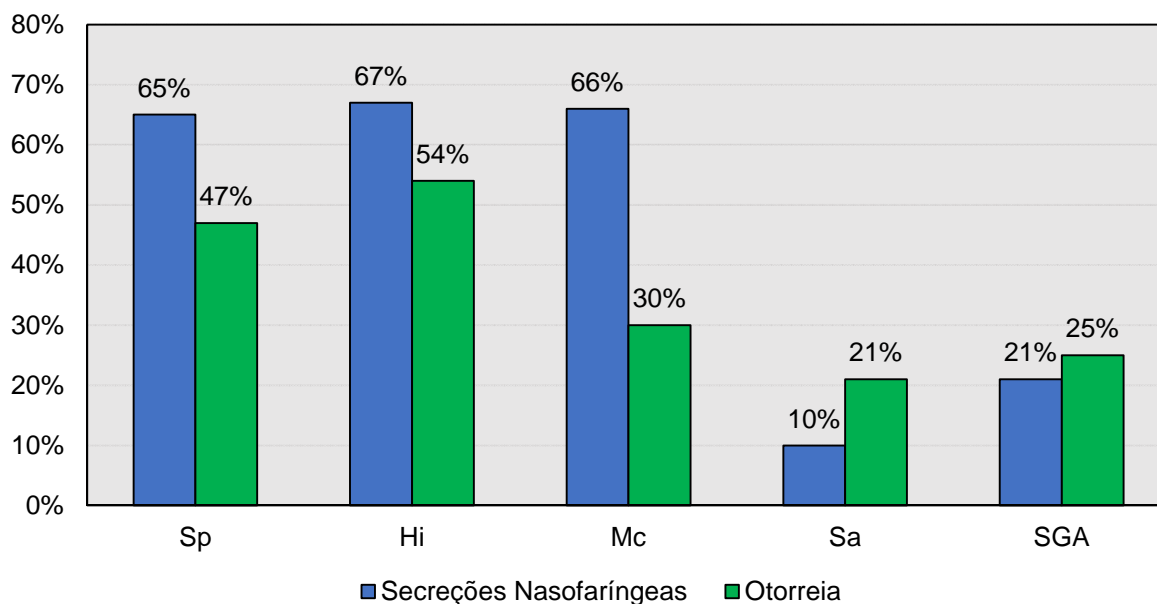


Gráfico 1 – Percentagem de identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções nasofaríngeas.

Verificou-se uma associação significativa ($p \leq 0,001$) entre a presença de cada espécie na NF e a sua presença na otorreia, com a presença na NF a aumentar a probabilidade de identificação na otorreia.

Avaliou-se, depois, a percentagem de casos em que, estando a bactéria presente na otorreia, se encontrava simultaneamente presente nas secreções nasofaríngeas (Gráfico 2). Esta percentagem revelou-se muito elevada para Sp, Hi, Mc e SGA e baixa para Sa.

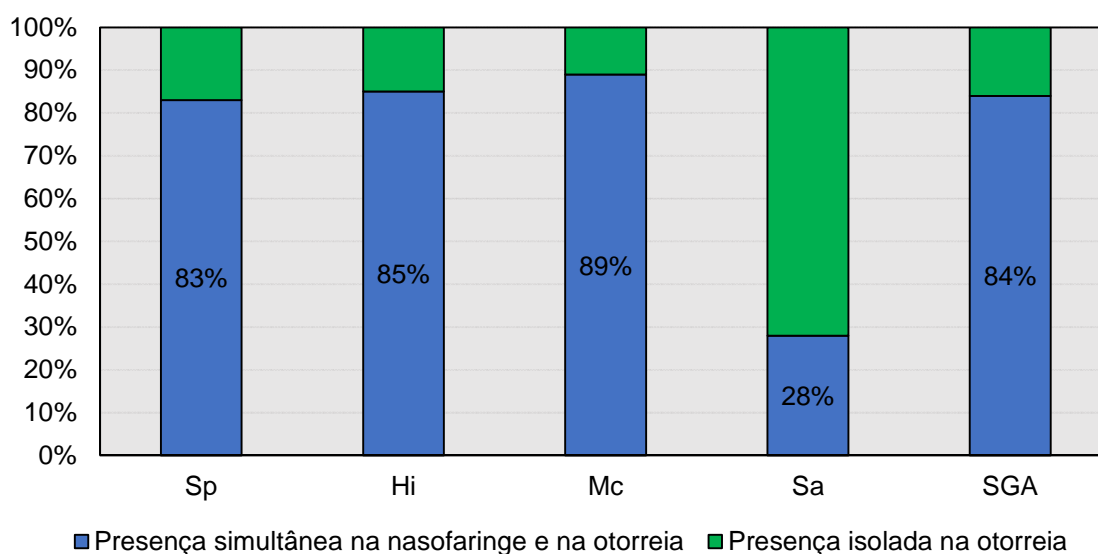


Gráfico 2 – Bactérias presentes na otorreia e simultaneamente nas secreções nasofaríngeas.

Das 151 crianças incluídas no estudo, 124 (82%) cumpriam critérios de OMA e 27 (18%) de OMAR. Os dados clínicos e demográficos dos dois grupos são apresentados na Tabela II.

Tabela II – Dados demográficos e clínicos das crianças com otite média aguda (OMA) e com otite média aguda recorrente (OMAR).

| | OMA n=124 (82%) | OMAR n=27 (18%) | p |
|---|----------------------------|----------------------------|----------|
| Sexo masculino nº (%) | 69 (56%) | 16 (59%) | 0,732* |
| Idade média mediana (min-máx) | 31 26 (2-81) | 32 23 (9-80) | 0,848** |
| Vacina conjugada pneumocócica (%) | 84% | 93% | 0,369*** |
| Frequência de infantário (%) | 82% | 100% | 0,015*** |
| Febre (%) | 63% | 35% | 0,007* |
| Otalgia ou irritabilidade (%) | 94% | 92% | 0,652*** |
| Antibiótico no último mês (%) | 12% | 52% | <0,001* |
| Antibiótico à data da colheita (%) | 5% | 7% | 0,634*** |

*Teste Qui-quadrado **Teste U de Mann-Whitney *** Teste exato de Fisher

Verificaram-se associações significativas entre a frequência de infantário, a presença de febre (OR=0,305, IC a 95% 0,126-0,742) e a utilização de antibiótico no mês anterior à colheita (OR=7,826, IC a 95% 3,094-19,795) e a recorrência das infeções: as crianças que frequentam o infantário, assim como as que receberam antibiótico no mês anterior à colheita, tiveram OMAR com maior frequência. Verificou-se também que é menos provável a presença de febre nas crianças com OMAR, comparativamente com as crianças com OMA. A proporção de doentes do sexo masculino, a idade média, a taxa de vacinação, a presença de otalgia ou irritabilidade e a taxa de utilização de antibiótico à data da colheita não mostraram relação com a recorrência das infeções.

Analizou-se, em seguida, a presença das diferentes espécies bacterianas em cada um dos grupos (Tabela III), tanto na otorreia (Gráfico 3) como nas secreções nasofaríngeas (Gráfico 4).

Tabela III – Detecção das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções nasofaríngeas (NF) em cada um dos grupos com otite média aguda (OMA) e com otite média aguda recorrente (OMAR).

| Espécie | Local | OMA nº (%) | OMAR nº (%) | p |
|----------------|--------------|-----------------------|------------------------|----------|
| Sp | Otorreia | 53 (43%) | 18 (67%) | 0,024* |
| | NF | 77 (62%) | 21 (78%) | 0,122* |
| Hi | Otorreia | 61 (49%) | 21 (78%) | 0,007* |
| | NF | 82 (66%) | 19 (70%) | 0,671* |
| Mc | Otorreia | 34 (27%) | 11 (41%) | 0,170* |
| | NF | 82 (66%) | 17 (63%) | 0,754* |
| Sa | Otorreia | 26 (21%) | 6 (22%) | 0,885* |
| | NF | 12 (10%) | 3 (11%) | 0,733** |
| SGA | Otorreia | 30 (24%) | 7 (26%) | 0,850* |
| | NF | 28 (23%) | 4 (15%) | 0,371* |

*Teste Qui-quadrado ** Teste exato de Fisher

Há maior probabilidade de detetar Sp ($p=0,024$; $OR=2,679$; IC a 95% 1,116-6,432) e Hi ($p=0,007$; $OR=3,615$; IC a 95% 1,366-9,566) na otorreia das crianças com OMAR, relativamente às crianças com OMA. As restantes espécies não apresentaram associações significativas ($p>0,05$).

Na colonização nasofaríngea, não se verificou existir associação significativa entre a presença de determinada espécie e a recorrência das infeções para nenhuma das espécies estudadas ($p>0,05$).

Para maior facilidade de visualização, as percentagens de identificação das diferentes bactérias na otorreia e na NF, no grupo de crianças com OMA e OMAR, são também apresentadas nos Gráficos 3 e 4, respetivamente.

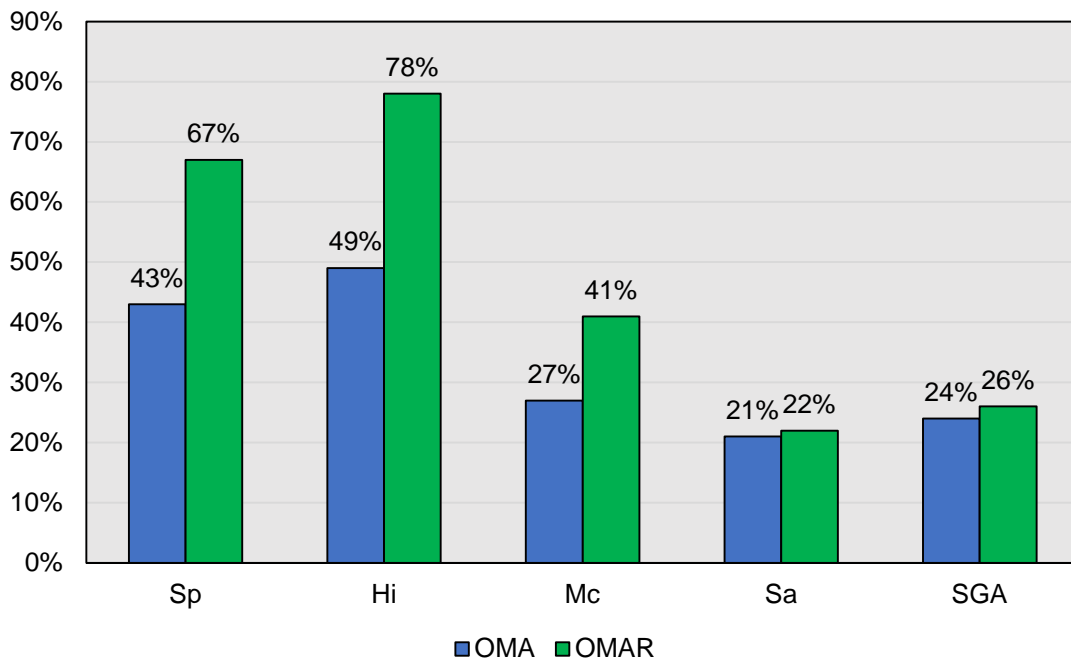


Gráfico 3 – Frequência de identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia das crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR).

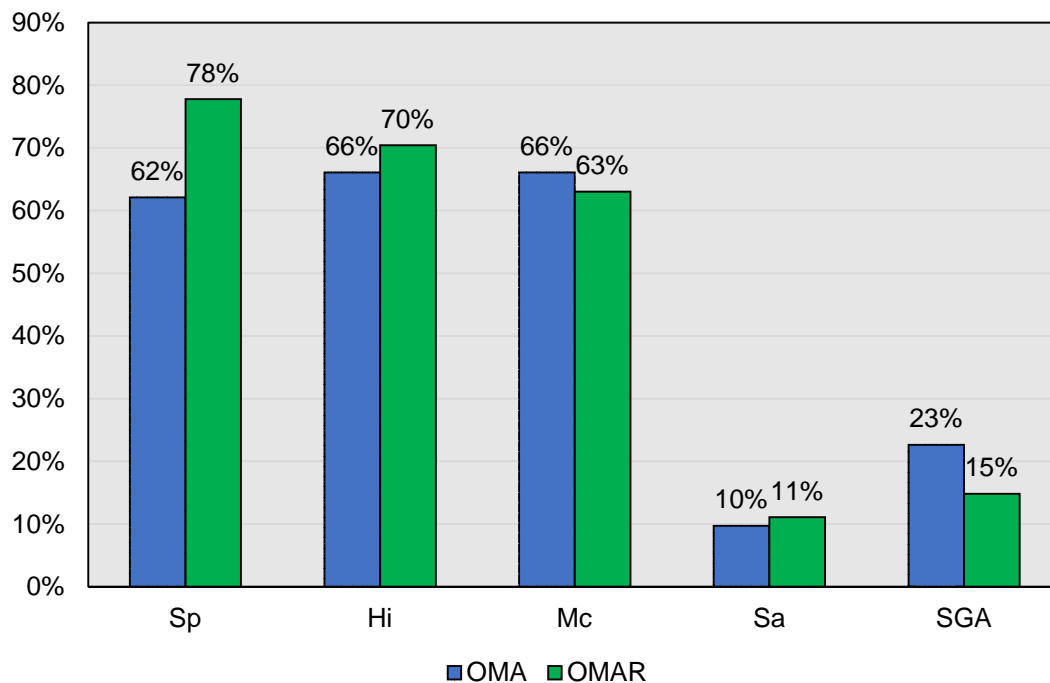


Gráfico 4 – Frequência de identificação das diferentes espécies bacterianas na otorreia das crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR).

Foram identificadas 2 ou mais bactérias na otorreia de 87 (58%) crianças, das 151 incluídas no estudo. A codeteção mais frequente foi de Sp, Hi e Mc, em 23 crianças (26% dos casos de codeteção), seguida de Sp e Hi, em 18 (21% dos casos de codeteção).

Para avaliar se a presença simultânea de várias espécies bacterianas é mais comum nas crianças com OMAR, quando comparadas com crianças com OMA, procedeu-se à análise da percentagem de crianças com 2 ou mais bactérias identificadas na otorreia em cada um dos grupos. Verificou-se que as crianças com OMAR apresentavam mais frequentemente 2 ou mais bactérias na otorreia ($p=0,001$; $OR=5,391$; IC a 95% 1,761-16,500). No que diz respeito à colonização da NF, não se verificou uma associação significativa ($p=0,775$) entre a identificação de múltiplas espécies na NF e a doença recorrente.

As percentagens de identificação de 0 ou 1 e de 2 ou mais espécies bacterianas no grupo de crianças com OMA e OMAR, na otorreia e na NF, são apresentadas nos Gráficos 5 e 6, respetivamente.

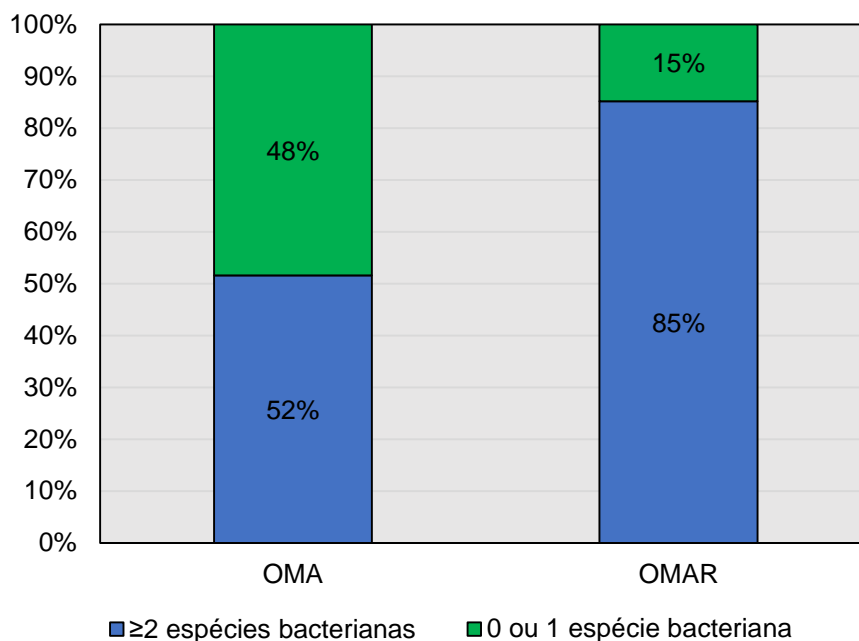


Gráfico 5 – Presença de múltiplas espécies bacterianas na otorreia de crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR).

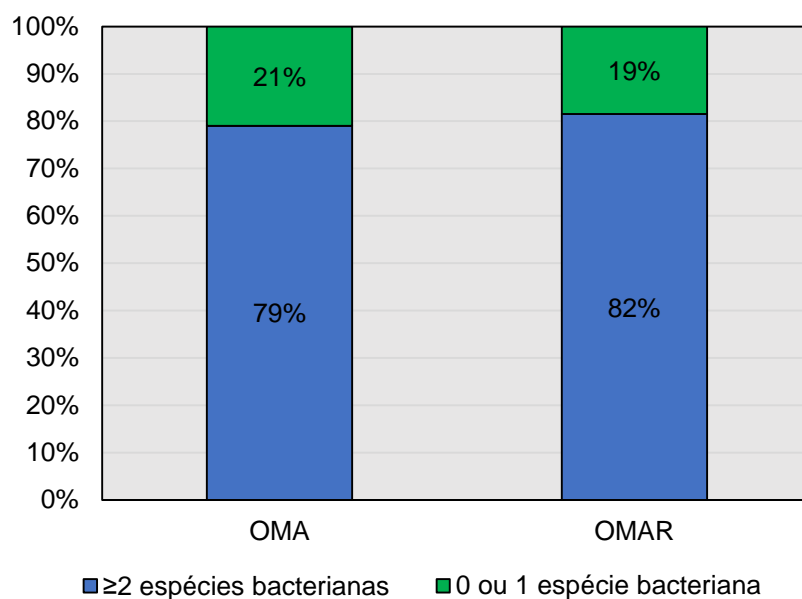


Gráfico 6 – Presença de múltiplas espécies bacterianas nas secreções nasofaríngeas (NF) de crianças com otite média aguda (OMA) e otite média aguda recorrente (OMAR).

Analisou-se, ainda, a presença das diferentes espécies bacterianas, na otorreia e nas secreções nasofaríngeas, no grupo de crianças vacinadas com pelo menos uma dose de vacina conjugada pneumocócica e no grupo das não vacinadas (Tabela IV e Gráfico 7).

Tabela IV – Frequência de detecção das diferentes espécies bacterianas na otorreia e nas secreções da nasofaringe (NF) das crianças vacinadas com vacina conjugada pneumocócica e não vacinadas.

| Espécie | Local | Vacinadas n=128 (85%) | Não vacinadas n=22 (15%) | p |
|------------|----------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| Sp | Otorreia | 55 (43%) | 15 (68%) | 0,029* |
| | NF | 83 (65%) | 14 (64%) | 0,913* |
| Hi | Otorreia | 70 (55%) | 11 (50%) | 0,684* |
| | NF | 89 (70%) | 12 (55%) | 0,166* |
| Mc | Otorreia | 41 (32%) | 3 (14%) | 0,080* |
| | NF | 87 (68%) | 11 (50%) | 0,102* |
| Sa | Otorreia | 27 (21%) | 5 (23%) | 0,786** |
| | NF | 12 (9%) | 3 (14%) | 0,463** |
| SGA | Otorreia | 33 (26%) | 4 (18%) | 0,445* |
| | NF | 26 (20%) | 6 (27%) | 0,573** |

*Teste Qui-quadrado ** Teste exato de Fisher

(n=150, uma criança não possui dados relativos à vacinação)

Verificou-se que *Sp* estava menos frequentemente presente ($p=0,029$; $OR=0,352$; IC a 95% 0,134-0,921) na otorreia das crianças vacinadas. Em relação à colonização da NF por *Sp*, não se verificou relação significativa com a vacinação ($p=0,913$).

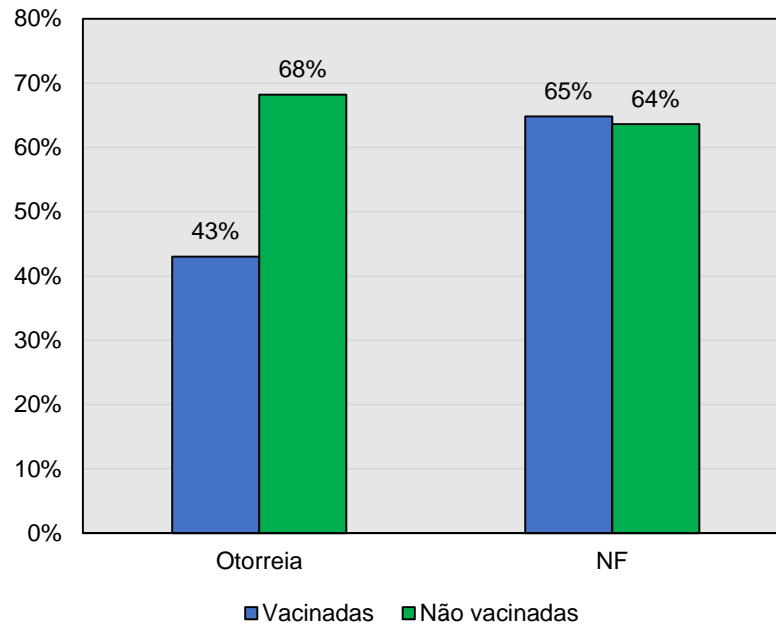


Gráfico 7 – Presença de *Streptococcus pneumoniae* na otorreia e nas secreções nasofaríngeas (NF) das crianças vacinadas com pelo menos uma dose de vacina conjugada pneumocócica (vacinadas) e nas não vacinadas.

A presença das outras espécies bacterianas, tanto na otorreia como na NF, não estava relacionada com a vacinação (Tabela IV).

DISCUSSÃO

A frequência da OMA em idade pediátrica, associada à crescente utilização das vacinas conjugadas pneumocócicas, com possibilidade de alteração da distribuição relativa dos microrganismos causadores de OMA, justificam a relevância da investigação nesta área. A informação sobre a etiologia da OMA em Portugal é muito escassa.

Este estudo avaliou a etiologia da OMA, na era das vacinas conjugadas pneumocócicas, em 151 crianças, que recorreram a um Serviço de Urgência Pediátrico em Coimbra. A vacina conjugada pneumocócica, embora só tendo sido incluída no PNV em 2015, era largamente utilizada no mercado privado até essa data, com coberturas vacinais mantidas superiores a 80% nesta população.

Houve identificação de pelo menos um microrganismo na otorreia em 128 (85%) crianças. A utilização da PCR contribuiu para esta taxa elevada, quando comparada com estudos que utilizaram os métodos habituais de cultura [3, 15-21].

Hi foi o germen mais frequentemente isolado (54%), à semelhança de outros estudos realizados na era pós-vacinal [5, 8, 31], seguido de Sp (47%), que continua a destacar-se como o agente mais frequente em múltiplas séries [16, 28]. Mc foi o terceiro agente e Sa e SGA foram identificados em proporções mais baixas. Num estudo prévio realizado em 2011 no Hospital Pediátrico – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, envolvendo cultura de otorreia espontânea de 113 crianças, 55 (48,7%) tiveram identificação de um microrganismo, que, por ordem decrescente de frequência, foram Sp (50,9%), SGA (30,9%), Mc (27,3%) e Hi (20,0%) [28]. Comparativamente ao presente estudo, destacam-se as semelhanças entre as populações e a área geográfica estudadas, bem como o método de colheita da amostra. Existem, no entanto, diferenças quanto ao tipo de análise microbiológica (cultura vs qPCR) e duração máxima da doença, que foi de 14 dias no estudo citado, em contraste com os 3 dias no estudo atual.

A utilização das vacinas conjugadas pneumocócicas tem vindo a influenciar não só a incidência de OMA, mas também a sua microbiologia. No presente estudo, verificou-se uma menor frequência de identificação de Sp na otorreia das crianças vacinadas, sem diferenças significativas na colonização da NF. Este facto pode dever-se a uma diminuição da presença de serotipos vacinais virulentos na NF, com conseqüente diminuição de progressão para OMA, ocorrendo, ao mesmo tempo, uma substituição por serotipos menos virulentos na NF.

O papel das vacinas conjugadas pneumocócicas na colonização da NF por Hi não é consensual, com alguns estudos a não mostrarem alterações [11, 33, 34], enquanto outros apresentam um aumento da sua prevalência [24, 35]. No presente estudo, não se

encontraram diferenças significativas entre a colonização nasofaríngea por Hi das crianças vacinadas e não vacinadas. Este facto poderá dever-se à atenuação das diferenças entre os grupos, conseqüente à imunidade de grupo induzida pela elevada cobertura vacinal observada.

A associação verificada entre a presença de determinada espécie bacteriana na NF e a sua presença na otorreia, suporta a colonização nasofaríngea por otopatogénios como ponto de partida e fator de risco para o desenvolvimento de OMA. Na criança, a maior horizontalidade e menor comprimento da tuba auditiva, comparativamente com o adulto, favorecem a migração de microrganismos presentes na NF para o ouvido médio, promovendo infeções nesta cavidade. A identificação de Sp, Hi, Mc e Sa, na NF, aumentou 5 a 7 vezes o risco de identificar as respetivas espécies na otorreia, enquanto para SGA se verificou um aumento de risco de 59 vezes. O facto de a presença simultânea na otorreia e na NF ser muito frequente para Sp (83%), Hi (85%), Mc (89%) e SGA (84%), também suporta os achados anteriores.

Apesar do limite de 3 dias de evolução da otorreia definido para inclusão no estudo, a deteção mais frequente de Sa e SGA na otorreia do que na NF pode traduzir, em alguns casos, contaminação do canal auditivo externo por estes agentes da pele. Adicionalmente, para Sa, só se verificou presença simultânea em ambos os fluidos biológicos em 25% dos casos, reforçando a hipótese de se tratar de contaminação.

Apesar de não ser objetivo deste estudo avaliar as particularidades da microbiologia das OMAO, relativamente à OMA no seu global, verificou-se uma percentagem elevada de SGA na otorreia (25%), comparativamente com a habitualmente relatada para a generalidade das OMA (2-10%) [15, 17, 19-21]. Este achado corrobora estudos prévios [28, 31, 36], cujo método de colheita de amostras biológicas também se baseou na presença de otorreia espontânea, assim como uma meta-análise de 10 estudos, onde se verificou ser mais provável identificar SGA em amostras de otorreia, comparativamente com amostras colhidas por timpanocentese [8]. Tal facto deve-se, possivelmente, a uma maior agressividade local do SGA, quando comparado com outros agentes [28, 31, 36]. Nessa mesma meta-análise [8], Mc mostrava menor probabilidade de ser isolada na otorreia espontânea, facto que não se verificou neste estudo.

A OMA constitui um espectro de doença que abrange doença não complicada e doença complexa, na qual se inclui a OMAR.

Um estudo efetuado em Rochester, Nova Iorque, entre 2006 e 2016, em 615 crianças, mostrou haver maior risco de OMAR nas crianças do sexo masculino, com história familiar

de OMA e que frequentassem a creche [5]. Na nossa amostra, não se verificou uma relação significativa entre o sexo masculino e a ocorrência de infeções recorrentes ($p=0,732$). No entanto, observou-se que entre as crianças que frequentavam o infantário, havia maior probabilidade de OMAR, constituindo um fator de risco para a recorrência da doença, provavelmente por potenciar um maior contacto interpessoal e haver, igualmente, um aumento de risco de colonização bacteriana da NF [25]. A utilização de antibiótico no mês anterior à colheita, foi significativamente mais frequente entre as crianças com OMAR, atestando a possível relação com a alteração da flora e microambiente do ouvido médio e seleção de espécies resistentes, propiciando a recorrência e ausência de resposta ao tratamento [37]. Pode, de igual forma, ser consequente à própria recorrência das OMA, que pode acarretar um maior consumo antibiótico por parte das crianças neste grupo. A maior probabilidade de apresentação com febre no grupo de crianças com OMA, corrobora achados de estudos anteriores, que relacionam a OMA não complicada, i.e. não recorrente, com resposta inflamatória mais exacerbada, condicionando clínica mais severa, como febre mais elevada [2].

Na doença recorrente, Hi é o microrganismo mais frequentemente isolado, o que pode indicar uma maior associação entre este agente e OMA complicadas [3, 5, 29, 30]. Este patogénio é, habitualmente, menos identificado no primeiro episódio de OMA. No presente estudo, confirmou-se a associação significativa entre Hi e a doença recorrente, com uma maior taxa de identificação deste agente nas crianças com OMAR. Apesar de alguns autores referirem que Sp está menos frequentemente relacionado com doença recorrente [5, 8], neste estudo verificou-se uma associação positiva entre a presença de Sp na otorreia e a recorrência das infeções, com uma taxa elevada de identificação na otorreia das crianças com OMAR.

Não se encontraram diferenças significativas na taxa de identificação das diferentes espécies na NF entre as crianças com OMA e OMAR, ao contrário de alguns estudos, nos quais foram mais frequentemente detetados otopatogénios a colonizar a NF de crianças com história de OMAR do que de controlos saudáveis [30, 38, 39].

A OMA pode ser causada por um agente único ou por agentes múltiplos. Apesar de vários otopatogénios coexistirem em colonização nasofaríngea, frequentemente, apenas um é detetado na otorreia da OMA [26]. É possível que a OMA ocorra num *continuum* de doença, desencadeada por um patogénio único (habitualmente Sp), com evolução posterior, em alguns casos, para doença complexa, causada por agentes múltiplos, nomeadamente Hi [2]. A otite média causada por patogénios múltiplos ocorre mais frequentemente em crianças mais velhas e com história de OMA prévia [3, 11, 18].

A coinfeção mais frequentemente descrita é por Sp e Hi não tipável, e é habitualmente mais severa do que a doença causada por cada agente patogénico individualmente [3, 11, 18]. Neste estudo, a percentagem de crianças que apresentava mais que uma bactéria na otorreia foi de 58%. Este achado poderá dever-se ao facto de os participantes terem todos otorreia espontânea, manifestação mais frequente em crianças com um ou mais episódios prévios de OMA [36], enriquecendo a amostra com crianças com otite complicada e tendência à recorrência e, por esse motivo, com maior probabilidade de apresentarem patogénios múltiplos. A utilização de PCR poderá também ter contribuído para o aumento da percentagem de deteção de patogénios múltiplos. A coinfeção mais frequente foi Sp, Hi e Mc (26% dos casos de codeteção), seguida da coinfeção por Sp e Hi (21% dos casos de codeteção).

Um estudo realizado em Israel, em amostras de otorreia colhidas durante 14840 episódios de OMA [18], mostrou associação entre as infeções por patogénios múltiplos e a recorrência dos episódios. No presente estudo, a percentagem de crianças com OMAR que tinham 2 ou mais espécies bacterianas na otorreia foi de 85%, uma taxa significativamente mais elevada do que a encontrada no grupo de crianças sem OMAR (52%).

É também mais frequente a deteção de espécies bacterianas resistentes aos antibióticos a colonizar crianças com infeções recorrentes do que nos controlos saudáveis [39], o que pode contribuir para a recorrência, apesar do tratamento instituído. A colonização por múltiplas espécies bacterianas parece constituir um estado de colonização distinto, em ambiente seletivo, com altas densidades bacterianas e perfis de serotipos característicos [11].

Os biofilmes são comunidades microbiológicas estruturadas, envoltas numa matriz polimérica produzida pelos organismos nelas contidas e que se encontram aderentes a uma superfície viva inerte [37]. Foi demonstrada a presença de biofilmes polimicrobianos no fluido do ouvido médio de crianças com OMAR, sendo que as causadas por Sp envolvem, frequentemente, a formação deste tipo de biofilmes, em conjunto com o Hi não tipável [3]. Dos microrganismos causadores de OMAR ou de falência terapêutica, uma percentagem elevada é formadora de biofilmes, independentemente do seu padrão de resistências antibióticas [37], pensando-se que esta capacidade pode contribuir para a recorrência dos episódios, interferindo com a penetração e atividade antibiótica no local de infeção [30]. O facto de serem mais frequentemente isolados microrganismos produtores de biofilmes na NF de crianças com OMAR, mesmo fora dos episódios agudos, sugere a sua persistência fora dos períodos de infeção [37, 38]. É também mais frequente não se verificar crescimento bacteriano nas OMAR através dos métodos de cultura convencionais, facto que suporta o

envolvimento de biofilmes [29, 30]. É possível que os organismos encontrados a colonizar a NF de crianças com OMAR difiram dos encontrados no fluido do ouvido médio, refletindo a presença de biofilmes como fonte distinta de microrganismos responsáveis pela recorrência [30].

Evidências crescentes suportam que a OMA e a OMAR se inserem num espectro de doença, cuja patogenia depende e varia de acordo com o microambiente que se desenvolve na cavidade do ouvido médio, com a crescente cronicidade da doença. Inicialmente, a OMA pode representar a penetração do ouvido médio por uma única espécie bacteriana. No entanto, esta condição pode complicar-se à medida que mais espécies se juntam ao processo, aproximando-se do ambiente com flora múltipla da nasofaringe [28].

Antes da utilização generalizada das vacinas, os serotipos vacinais eram os que apresentavam maiores taxas de progressão para doença, a partir do estado de portador [13]. O fenómeno de substituição por serotipos não vacinais de menor virulência explica a redução na incidência total dos casos de OM após a introdução das vacinas [3]. A capacidade do Sp para a produção de biofilmes é maior nos serotipos menos invasivos, mais frequentemente associados a doença complexa, e em casos de coinfeção com Hi não tipável [18].

Como limitações deste estudo temos o número relativamente pequeno de crianças com OMAR, os aspetos já mencionados da possibilidade de ocorrer contaminação por gérmens da pele quando se obtém a amostra biológica a partir da otorreia, e o facto de os participantes com otorreia espontânea serem crianças com maior probabilidade de otite complicada e tendência à recorrência. Não foi feita a serotipagem do pneumococo, o que nos permitiria perceber melhor a dinâmica das diferentes espécies bacterianas.

Nos projetos para o futuro, pretendemos efetuar um estudo com maior dimensão da amostra nos casos de OMAR e com obtenção de produto de otorreia no primeiro dia de doença, para ultrapassar as limitações referidas.

CONCLUSÃO

As bactérias mais frequentemente detetadas na otorreia de crianças com OMA foram Hi e Sp. A presença de bactérias na NF relacionou-se com a sua presença na otorreia, na medida em que a primeira aumentou a probabilidade da segunda.

A frequência de infantário e a toma recente de antibiótico foram fatores de risco encontrados nas crianças com OMAR. Há uma maior probabilidade de detetar Sp e Hi na otorreia das crianças com OMAR, relativamente às crianças com OMA.

Crianças com OMAR tinham com maior frequência múltiplas espécies bacterianas na otorreia, o que poderá, em parte, explicar a maior dificuldade de tratamento e a menor efetividade das vacinas pneumocócicas conjugadas nestas crianças.

No grupo de crianças que receberam vacina conjugada pneumocócica, verificou-se uma menor taxa de identificação de Sp na otorreia, não estando a presença das outras espécies bacterianas relacionada com a vacinação.

AGRADECIMENTOS

Às crianças e respetivas famílias, pela participação no estudo, sem a qual a realização do presente trabalho não seria possível.

À Professora Doutora Fernanda Rodrigues e à Doutora Ana Sofia Simões pela orientação, apoio e conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho. Agradeço, em especial, à Professora Fernanda, por ter contribuído, de forma ativa, para o meu interesse na área, não só como profissional de saúde, mas também como docente.

Ao Professor Doutor Francisco Caramelo pela disponibilidade e auxílio na realização da análise estatística dos dados.

Às enfermeiras e educadoras que colaboraram nas colheitas e à equipa laboratorial da Universidade de Bristol.

Aos meus amigos pela motivação e desafio mútuo, juntos chegamos mais longe.

Aos meus pais, pelo incentivo e suporte incondicionais e constantes. A eles devo e agradeço todas as oportunidades para me tornar quem sou e serei.

Projeto da iniciativa do investigador financiado pela Pfizer

Aceite para apresentação na *37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID)*, Ljubljana, Slovenia | May 6 – 11, 2019.

Abstract Number: ESPID19-0841

Abstract Title: Multiple bacterial species are more often present in recurrent acute otitis media (RAOM)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kong, K. and H.L. Coates, *Natural history, definitions, risk factors and burden of otitis media*. Med J Aust, 2009. **191**(9 Suppl): p. S39-43.
2. Dagan, R., et al., *Prevention of early episodes of otitis media by pneumococcal vaccines might reduce progression to complex disease*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(4): p. 480-92.
3. Lewnard, J.A., et al., *Pneumococcal Phenotype and Interaction with Nontypeable Haemophilus influenzae as Determinants of Otitis Media Progression*. Infect Immun, 2018. **86**(6).
4. Monasta, L., et al., *Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e36226.
5. Kaur, R., M. Morris, and M.E. Pichichero, *Epidemiology of Acute Otitis Media in the Postpneumococcal Conjugate Vaccine Era*. Pediatrics, 2017. **140**(3).
6. Rovers, M.M., *The burden of otitis media*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 7**: p. G2-4.
7. Kawai, K., et al., *Ambulatory Visits for Otitis Media before and after the Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccination*. J Pediatr, 2018.
8. Van Dyke, M.K., et al., *Etiology of Acute Otitis Media in Children Less Than 5 Years of Age: A Pooled Analysis of 10 Similarly Designed Observational Studies*. Pediatr Infect Dis J, 2017. **36**(3): p. 274-281.
9. Chen, Y.J., et al., *Clinical manifestations and microbiology of acute otitis media with spontaneous otorrhea in children*. J Microbiol Immunol Infect, 2013. **46**(5): p. 382-8.
10. Talathi, S., et al., *Otitis Media in Fully Vaccinated Preschool Children in the Pneumococcal Conjugate Vaccine Era*. Glob Pediatr Health, 2017. **4**: p. 2333794X17749668.
11. Lewnard, J.A., et al., *Density, Serotype Diversity, and Fitness of Streptococcus pneumoniae in Upper Respiratory Tract Cocolonization With Nontypeable Haemophilus influenzae*. J Infect Dis, 2016. **214**(9): p. 1411-1420.
12. Simell, B., et al., *The fundamental link between pneumococcal carriage and disease*. Expert Rev Vaccines, 2012. **11**(7): p. 841-55.
13. Lewnard, J.A., et al., *Pan-serotype Reduction in Progression of Streptococcus pneumoniae to Otitis Media After Rollout of Pneumococcal Conjugate Vaccines*. Clin Infect Dis, 2017. **65**(11): p. 1853-1861.
14. Prates, M.C.M., et al., *The Relationship between Colonization by*. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2018. **2018**: p. 5406467.

15. Dupont, D., et al., *Evolving microbiology of complicated acute otitis media before and after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine in France*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010. **68**(1): p. 89-92.
16. Ngo, C.C., et al., *Predominant Bacteria Detected from the Middle Ear Fluid of Children Experiencing Otitis Media: A Systematic Review*. *PLoS One*, 2016. **11**(3): p. e0150949.
17. Ben-Shimol, S., et al., *Impact of Widespread Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccines on Pneumococcal and Nonpneumococcal Otitis Media*. *Clin Infect Dis*, 2016. **63**(5): p. 611-8.
18. Dagan, R., et al., *Mixed pneumococcal-nontypeable Haemophilus influenzae otitis media is a distinct clinical entity with unique epidemiologic characteristics and pneumococcal serotype distribution*. *J Infect Dis*, 2013. **208**(7): p. 1152-60.
19. Lieberthal, A.S., et al., *The diagnosis and management of acute otitis media*. *Pediatrics*, 2013. **131**(3): p. e964-99.
20. Coker, T.R., et al., *Diagnosis, microbial epidemiology, and antibiotic treatment of acute otitis media in children: a systematic review*. *JAMA*, 2010. **304**(19): p. 2161-9.
21. *American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis Media, Diagnosis and management of acute otitis media*. *Pediatrics*, 2004. **113**(5): p. 1451-65.
22. *Direção Geral de Saúde, Norma nº16/2016, de 16/12/2016, atualizada em 31 de julho de 2017*.
23. Ben-Shimol, S., et al., *Pneumococcal nasopharyngeal carriage in children <5 years of age visiting the pediatric emergency room in relation to PCV7 and PCV13 introduction in southern Israel*. *Hum Vaccin Immunother*, 2016. **12**(2): p. 268-76.
24. Bosch, A.A.T.M., et al., *Nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae and other bacteria in the 7th year after implementation of the pneumococcal conjugate vaccine in the Netherlands*. *Vaccine*, 2016. **34**(4): p. 531-539.
25. Cohen, R., et al., *A 13-year survey of pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 and PCV13 implementation*. *Vaccine*, 2015. **33**(39): p. 5118-26.
26. Pichichero, M.E., *Ten-Year Study of Acute Otitis Media in Rochester, NY*. *Pediatr Infect Dis J*, 2016. **35**(9): p. 1027-32.
27. Gisselsson-Solen, M., *Trends in Otitis Media Incidence After Conjugate Pneumococcal Vaccination: A National Observational Study*. *Pediatr Infect Dis J*, 2017. **36**(11): p. 1027-1031.

28. Rodrigues, F., et al., *Multiple Streptococcus pneumoniae serotypes in aural discharge samples from children with acute otitis media with spontaneous otorrhea*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(10): p. 3409-11.
29. Pumarola, F., et al., *Microbiology of bacteria causing recurrent acute otitis media (AOM) and AOM treatment failure in young children in Spain: shifting pathogens in the post-pneumococcal conjugate vaccination era*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2013. **77**(8): p. 1231-6.
30. Thornton, R.B., et al., *Neutrophil extracellular traps and bacterial biofilms in middle ear effusion of children with recurrent acute otitis media--a potential treatment target*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e53837.
31. Marchisio, P., et al., *Prospective evaluation of the aetiology of acute otitis media with spontaneous tympanic membrane perforation*. Clin Microbiol Infect, 2017. **23**(7): p. 486.e1-486.e6.
32. Marchisio, P., et al., *A retrospective evaluation of microbiology of acute otitis media complicated by spontaneous otorrhea in children living in Milan, Italy*. Infection, 2013. **41**(3): p. 629-35.
33. Dunne, E.M., et al., *Effect of pneumococcal vaccination on nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, and Staphylococcus aureus in Fijian children*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(3): p. 1034-8.
34. van Gils, E.J., et al., *Effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage with Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in a randomized controlled trial*. Vaccine, 2011. **29**(44): p. 7595-8.
35. Olwagen, C.P., et al., *Evaluation of the association of pneumococcal conjugate vaccine immunization and density of nasopharyngeal bacterial colonization using a multiplex quantitative polymerase chain reaction assay*. Vaccine, 2018. **36**(23): p. 3278-3285.
36. Leibovitz, E., et al., *Epidemiologic and microbiologic characteristics of culture-positive spontaneous otorrhea in children with acute otitis media*. Pediatr Infect Dis J, 2009. **28**(5): p. 381-4.
37. García-Cobos, S., et al., *Frequent carriage of resistance mechanisms to β -lactams and biofilm formation in Haemophilus influenzae causing treatment failure and recurrent otitis media in young children*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(9): p. 2394-9.

38. Torretta, S., et al., *Nasopharyngeal biofilm-producing otopathogens in children with nonsevere recurrent acute otitis media*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012. **146**(6): p. 991-6.
39. Marchisio, P., et al., *Differences in nasopharyngeal bacterial flora in children with nonsevere recurrent acute otitis media and chronic otitis media with effusion: implications for management*. *Pediatr Infect Dis J*, 2003. **22**(3): p. 262-8.