

Patogênese da Otite Média Grave em Crianças da Austrália Ocidental: Uma Revisão

*Shyan Vijayasekaran, Harvey Coates, Ruth B. Thornton,
Selma P. Wiertsema, Lea-Ann S. Kirkhamd, Sarra E.
Jamieson, Marie Rye e Peter C. Richmond*

Introdução

Mais de 80% das crianças experimentam pelo menos um episódio de otite média aguda (OMA) até a idade de 3 anos, e 46% experimentam 3 episódios ou mais¹. Complicações supuradas da OMA, como a meningite, abscesso cerebral e trombose do seio lateral são relativamente incomuns nos países desenvolvidos devido à disponibilidade imediata de antibióticos e intervenções cirúrgicas. No entanto, a carga desta doença nestes países é substancial. Na Austrália ocorreram 793.535 casos de OMA em 2003 que afetaram crianças entre 0 e 14 anos de idade², e 73% das crianças australianas já tiveram OMA ao redor dos 12 meses de idade³. Em 2008, a perda auditiva temporária afetou 354.457 crianças e a perfuração da membrana timpânica (MT) afetou 87.655 crianças³. Os australianos nativos são desproporcionalmente afetados e têm as maiores taxas mundiais registradas de otite média grave (OM), incluindo otite média crônica supurada (OMCS).⁴

A identificação da etiologia da AOM é frequentemente difícil de estabelecer. A amostragem direta do fluido da orelha média (FOM) não está normalmente indicada e embora as amostras de nasofaringe sejam mais facilmente disponíveis, nem sempre fica claro se os patógenos detectados representam a verdadeira etiologia ou são portadores assintomáticos. Quando uma etiologia é identificada as bactérias mais frequentemente observadas são: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*⁵⁻⁷

A OMA é frequentemente autolimitada, mas cerca de 50% das crianças experimentam outro episódio dentro de 1 a 3 meses⁸. A OMA recorrente (OMAR) é geralmente definida como a ocorrência de três episódios em 6 meses ou 4 episódios ou mais em 12 meses e pode estar acompanhada de otite média com efusão (OME). Complicações de OMAR e OME crônica (OMEC) incluem perfurações da MT, perda e atrasos no desenvolvimento da fala, da linguagem e da audição⁸. O porquê de algumas crianças desenvolverem otite média crônica ou recorrente não está bem estabelecido, mas é cada vez mais reconhecido que fatores ambientais, de desenvolvimento e microbiológicos genéticos possam contribuir^{9,10}

Uma equipe multidisciplinar em nossas instituições realizam uma investigação sobre a microbiologia, aspectos imunológicos e genéticos de OMAR e da OMEC em crianças.

Evidências da predisposição genética para a OM grave

Estudos em gêmeos revelam um componente hereditário substancial para a OMAR ou OME¹¹⁻¹³. Para delinear este componente genético de suscetibilidade da OMAR desenvolvemos um estudo de associação do gene candidato com foco em genes identificados a partir de dois modelos em ratos com OM grave e espontânea

identificadas por pesquisadores no Reino Unido¹⁴⁻¹⁵. As mutações subjacentes a estes modelos com camundongos mapeados para o gene *Evil1* e o gene *Fbxo11*. O nosso grupo avaliou a associação entre polimorfismos em homólogos humanos, *EVII* e *FBXO11*, e suscetibilidade a OMAR ou OMEC em uma coorte de famílias tratadas pelos autores (Estudo de Famílias Australianas Ocidentais com OM)¹⁶ e em uma coorte única de crianças acompanhadas longitudinalmente desde o nascimento por 20 anos (Estudo de Coorte de Gravidez na Austrália Ocidental, ou "Estudo Raine" - *The Western Australian Pregnancy Cohort Study*, ou 'Raine Study').¹⁷

Amostras de DNA foram coletadas em 561 crianças afetadas e seus pais, representando 434 famílias. As crianças acometidas tinham ≥ 3 episódios, diagnosticados por médico de OMAR ou inserção de tubos de ventilação para OMAR/OMEC. Também foi realizada a análise dirigida dos dados do *chip* SNP de todo o genoma em 1198 pessoas (253 crianças com OM grave com base na revisão de prontuários e 866 controles) que participaram do Estudo Raine.

Encontramos uma associação significativa entre polimorfismos de nucleotídeo único no *FBXO11* e OM grave ou OMAR em ambos os grupos ($p \leq 0,009$), mas nenhuma associação consistente para qualquer uma das variantes *EVII* foi avaliada¹⁶. A análise multivariada mostrou que a associação em *FBXO11* era independente de fatores de risco ambientais associados para a OM (ou seja, creche, alergia). Como ambas as proteínas *EVII* e *FBXO11* parecem interagir no fator de crescimento de transformação (*TGF- β*) via de sinalização, estes dados confirmam uma base genética para a susceptibilidade da OMA grave e sugerem que esta pode ser mediada por variantes em que *FBXO11* resulta em disfunção inflamatória alterando a regulação da via de *TGF- β* . É importante salientar que os polimorfismos *FBXO11* associados a OM grave em nosso estudo não foram os mesmos que aqueles identificados por um estudo nos EUA em 142 famílias com OM grave¹⁷. Mais estudos são necessários para avaliar possíveis variações na distribuição geográfica das variantes *FBXO11*, para investigar o mecanismo pelo qual variantes *FBXO11* aumenta o risco de OM grave, e para considerar as implicações para a identificação e tratamento de crianças com uma tendência genética para desenvolver a doença grave da orelha média.

Estudo do Tubo de Ventilação: avaliando a microbiologia e a imunologia das crianças com OMAR

Para avaliar a presença de bactérias e vírus na nasofaringe, bem como a etiologia da infecção da orelha média em crianças da Austrália Ocidental com OMAR, 201 crianças com menos de 36 meses de idade, com histórico de OMAR e que foram submetidas a inserção de tubos de ventilação (casos), foram recrutadas para o Estudo de Tubo de Ventilação¹⁸. Como pré-requisito para a cirurgia, saúde em boas condições, ou seja, todas as crianças deveriam estar com poucos sintomas no momento do exame. Simultaneamente, inscrevemos uma coorte de crianças saudáveis <36 meses de idade, sem OM, que foram submetidas à cirurgia por outras razões (controles, n=81). Esfregaços da nasofaringe e amostras de sangue foram coletadas enquanto as crianças eram anestesiadas e foram coletadas amostras de casos de FOM após a miringotomia e antes da inserção do tubo de ventilação. Foram feitas culturas nas amostras da nasofaringe e FOM para as bactérias [S.

pneumoniae, *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi), *M. catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* β-hemolítico] utilizando-se métodos padrão. As amostras também foram analisadas utilizando-se o multiplex PCR em tempo real para a presença de 10 vírus respiratórios.

A prevalência da presença de uma ou mais bactérias de interesse foi significativamente maior entre crianças com histórico de OMAR (79%) em relação ao controle das crianças saudáveis (53%, $p < 0,0001$), e foi significativamente maior nos casos do que nos controles em todos os grupos etários. Além disso, a distribuição da carga bacteriana diferiu significativamente entre os casos e os controles; o NTHi foi o patógeno mais frequentemente identificado nos casos, ao passo que *M. catarrhalis* foi a mais comum nos controles saudáveis. O NTHi e o *S. pneumoniae* foram identificadas com frequência mais significante nos casos do que nos controles (56% versus 19%, $p < 0,001$ para NTHi e 41% versus 26%, $p = 0,002$ para *S. pneumoniae*)¹⁸. Sorotipos da vacina conjugada *S. pneumoniae* PCV-7 foram raramente detectados (3% em cada grupo). Consistente com os dados da presença da situação pós-PCV-7 nos EUA¹⁸, o pneumococo 19A foi o sorotipo mais frequentemente isolado na nasofaringe de crianças com OMAR (13% das crianças).

Os casos também tiveram uma prevalência maior de colonização por 6 dos 10 vírus testados (rinovírus, vírus sincicial respiratório, bocavírus, adenovírus, vírus parainfluenza e poliomavírus WU/KI).¹⁹

De maneira significante, mais crianças com OMAR (76,7%) do que as crianças saudáveis (25,8%) estavam infectadas com mais de um vírus ($p < 0,001$). Nas amostras de FOM coletadas em 143 crianças, o rinovírus foi o mais frequentemente detectado (66/143 ou 46,2%),¹⁹. Entre os noventa e um casos com rinovírus detectados na nasofaringe, 61 (67%) também tiveram rinovírus detectados no FOM.

As amostras de soro foram igualmente examinadas para IgG para quatro *S. pneumoniae* e três proteínas NTHi que são candidatas para vacinas com base em proteínas. A investigação dos níveis de IgG séricos contra o pneumococo e antígenos protéticos do NTHi mostrou que crianças com histórico de OMAR apresentavam níveis significativamente mais altos de IgG contra 3 de 4 proteínas pneumocócicas (PspA2, CBPA e Ply) e contra todos os 3 das proteínas do NTHi. Os níveis de IgG significativamente mais elevados contra as proteínas específicas foram observados em crianças colonizadas com as respectivos bactérias, mas não quando o patógeno foi detectado no FOM. Os níveis de IgG contra cada uma das proteínas estudadas aumentaram significativamente com a idade.²⁰

A capacidade de montar uma resposta imunitária contra os antígenos específicos de proteínas bacterianas parece ser dependente da idade e influenciada pela via de exposição (OMA contra a colonização da nasofaringe)²¹. As crianças que são propensas à OM podem ter anormalidades imunológicas sutis que afetam aspectos da mucosa e/ou respostas imunológicas sistêmicas à infecção²². Alguns estudos sugerem respostas imunológicas reduzidas a proteínas específicas do NTHi e/ou do *S. pneumoniae* em crianças com tendência à otite²³⁻²⁴. Respostas insuficientes para antígenos específicos de patógenos comuns, como os do NTHi e do *S. pneumoniae* podem favorecer a persistência bacteriana e aumentar o risco para infecções recorrentes. O exame das amostras de soro dos casos e controles em nosso estudo sugere que

as crianças com OMAR não têm uma resposta imunológica diminuída em termos de níveis de IgG para proteínas específicas do NTHi ou pneumocócicas. Se a proteína específica circulante IgG será capaz de prevenir ou modular futuros episódios de otite média aguda, ou se a resposta imunológica natural irá refletir a resposta a vacinas da proteína candidata não se sabe, mas justifica um estudo mais aprofundado²⁵⁻²⁸

Biofilmes, patógenos DNS intracelulares e extracelulares na OMAR

Os biofilmes bacterianos podem ser definidos como agrupamentos de bactérias, embebidas em uma matriz polimérica. Os biofilmes têm sido relacionados com muitas das infecções nos seres humanos²⁹⁻³¹, sendo que as bactérias presentes dentro dos biofilmes mostram uma resistência aumentada a antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, quando comparadas com as bactérias "planctônicas", que "flutuam" livremente. Os biofilmes são colônias de bactérias, de uma ou mais espécies, enclausuradas dentro de uma matriz polisacarídica que se fixa ao tecido de superfície. A matriz age como uma barreira física para a atividade dos antibióticos e os biofilmes tem sido relacionados com várias infecções nos seres humanos²⁹⁻³¹. O DNA livre, derivado de células hospedeiras ou bactérias, facilita a formação de biofilmes e aumenta a viscosidade de exsudatos das mucosas. O sequestro intracelular é um outro meio pelo qual as bactérias evitam a atividade antibiótica e o sistema imunológico do hospedeiro.

Estudos limitados conduzidos até agora identificam biofilme na mucosa da orelha média, em 95% das crianças (46/50) com OME³¹ e em 80% dos adultos (8/10) com OMCS³². Bactérias intracelulares foram identificados em 36% (4/11) crianças com OME³¹. Embora os biofilmes no ambiente sejam muitas vezes de origem polimicrobiana, estamos conscientes de apenas um estudo que examina multi-espécies de biofilmes na orelha média³¹. Não temos conhecimento de quaisquer estudos em humanos que investigam o papel do DNA em efusões da orelha média de crianças com OM grave. Por isso investigamos a hipótese de que o biofilme bacteriano e a infecção intracelular estão presentes na mucosa da orelha média de crianças com OMAR e OME crônica, que estes biofilmes são de origem polimicrobianas e que aquele DNA extracelular está associado a estas infecções. Biópsias da mucosa da orelha média foram examinadas usando hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e microscopia confocal a laser (CLSM). Também investigamos FOM de crianças com OMAR para DNA extracelular e bactérias vivas.

Foram recrutadas dezessete crianças entre 0 e 10 anos de idade submetidas a inserção do tubo de ventilação para OME ou OMAR, bem como um controle saudável (uma criança submetida a cirurgia de implante coclear). Durante a cirurgia, foram realizadas biópsias da mucosa da orelha média e avaliadas usando sondas específicas para o patógeno. Além disso, 36 efusões da orelha média de 24 crianças com OMAR que participaram do estudo de Tubo de Ventilação foram avaliados para a presença de DNA extracelular e bactérias vivas, utilizando coloração dos ácidos nucléicos e CLSM.

Os biofilmes estavam presentes em 65% (11 / 17) e as bactérias intracelulares foram observadas em 71% (12/17) das biópsias da mucosa da orelha média. A prevalência de biofilme e bactérias intracelulares foi semelhante em crianças com OMAR e naquelas com OME. Utilizando FISH, o NTHi foi identificado em 45%

das amostras analisadas (5/11), o *S. pneumoniae* em 40% (4/10) e a *M. catarrhalis*, em 58% (7/12). O *S. pneumoniae* e a *M. catarrhalis* estavam presentes tanto no meio intracelular como no biofilme, enquanto que o NTHi foi encontrado principalmente no meio intracelular.³³⁻³⁴

Um extenso emaranhado de fitas de DNA extracelular e bactérias vivas em formações multicelulares foram observadas nas amostras de FOM em 92% (33/36) e 88% (32/36), respectivamente. Este grande emaranhado de DNA foi posteriormente caracterizado e comprovado ser consistente com a presença de armadilhas extracelulares de neutrófilos. A adição de dextrinonuclease resultou na fragmentação de toda a matriz de DNA.³⁵⁻³⁷

Este foi o primeiro estudo a identificar simultaneamente patógenos da orelha média tanto em biofilmes bacterianos como no meio intracelular na mucosa da orelha média de crianças com OM grave, e ter identificado extenso emaranhado de DNA de FOM em crianças com OMAR. Estes resultados têm importantes implicações clínicas e estudos adicionais são necessários para avaliar o papel da desoxirribonuclease na prevenção ou gestão da OMAR, e identificar os meios pelos quais a penetração dos antibiótico nos biofilmes e patógenos intracelulares na orelha média podem ser melhorados.

Conclusão

Uma série de estudos originais realizados em colaboração com uma equipe multidisciplinar foram voltados para delinear aspectos da patogênese da OM grave. A interação de múltiplos fatores pode aumentar o risco das crianças desenvolverem doença grave da orelha média. Esses fatores tendem a diferir de condutores da simples OMA autolimitada. Nós confirmamos uma base genética para a susceptibilidade da OM grave com a associação de polimorfismos em *FBXO11*, possivelmente mediado por distúrbios na função anti-inflamatória. Não encontramos nenhuma evidência de imunodeficiência em crianças com OMA com níveis mais elevados de IgG no soro contra antígenos protéicos do pneumococo e do NTHi, quando comparados com os controles saudáveis. Mostramos que o NTHi e o rinovírus são mais frequentemente identificados na nasofaringe de crianças com OMAR comparados com os controles saudáveis e são, também, os patógenos predominantes encontrados na orelha média. O emaranhado do DNA foi identificado pela primeira vez no FOM de crianças com OMAR, e foram observados patógenos da orelha média sequestradas no meio intracelular e em biofilmes, possivelmente contribuindo para o fracasso do tratamento e recorrência da doença. Estas descobertas fundamentais irão conduzir mais pesquisas e têm implicações para a identificação, prevenção e tratamento de crianças com OM grave.

Referências bibliográficas

1. Teele DW, Klein JO, Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J. Infect. Dis.* 1989 Jul;160(1):83-94.
2. Begg S, Vos T, Barker B, Stevenson C, Stanley L, Lopez A. The burden of disease and injury in Australia 2003. Australian Institute of Health and Welfare; 2007.

3. Report by Access Economics Pty Limited for GlaxoSmithKline. The cost burden of otitis media in Australia. Perth: 2009.
4. Morris PS. A systematic review of clinical research addressing the prevalence, aetiology, diagnosis, prognosis and therapy of otitis media in Australian Aboriginal children. *J Paediatr Child Health*. 1998 Dec;34(6):487-497.
5. Massa HM, Cripps AW, Lehmann D. Otitis media: viruses, bacteria, biofilms and vaccines. *Med. J. Aust*. 2009 Nov 2;191(9 Suppl):S44-49.
6. Leibovitz E, Jacobs MR, Dagan R. Haemophilus influenzae: a significant pathogen in acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2004 Dec;23(12):1142-1152.
7. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics*. *J. Infect. Dis*. 1997 Jun;175(6):1440-1445.
8. Bluestone CD. Clinical course, complications and sequelae of acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2000 May;19(5 Suppl):S37-46.
9. Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-Schomerus G, Plomin R. Heritability of symptom domains in otitis media: a longitudinal study of 1,373 twin pairs. *Am. J. Epidemiol*. 2002 May 15;155(10):958-964.
10. Kong K, Coates HLC. Natural history, definitions, risk factors and burden of otitis media. *Med. J. Aust*. 2009 Nov 2;191(9 Suppl):S39-43.
11. Casselbrant ML, Mandel EM, Fall PA, Rockette HE, Kurs-Lasky M, Bluestone CD, et al. The heritability of otitis media: a twin and triplet study. *JAMA*. 1999 Dec 8;282(22):2125-2130.
12. Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-Schomerus G, Plomin R. Heritability of symptom domains in otitis media: a longitudinal study of 1,373 twin pairs. *Am. J. Epidemiol*. 2002 May 15;155(10):958-964.
13. Kvaerner KJ, Tambs K, Harris JR, Magnus P. Distribution and heritability of recurrent ear infections. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 1997 Aug;106(8):624-632.
14. Parkinson N, Hardisty-Hughes RE, Tateossian H, Tsai H-T, Brooker D, Morse S, et al. Mutation at the Evi1 locus in Junbo mice causes susceptibility to otitis media. *PLoS Genet*. 2006 Oct 6;2(10):e149.
15. Hardisty RE, Erven A, Logan K, Morse S, Guionaud S, Sancho-Oliver S, et al. The deaf mouse mutant Jeff (Jf) is a single gene model of otitis media. *J. Assoc. Res. Otolaryngol*. 2003 Jun;4(2):130-138.
16. Rye MS, Wiertsema SP, Scaman ESH, Oommen J, Sun W, Francis RW, et al. FBXO11, a regulator of the TGF β pathway, is associated with severe otitis media in Western Australian children. *Genes Immun* [Internet]. 2011 Feb 3 [cited 2011 Jun 27]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21293382>
17. Segade F, Daly KA, Allred D, Hicks PJ, Cox M, Brown M, et al. Association of the FBXO11 gene with chronic otitis media with effusion and recurrent otitis media: the Minnesota COME/ROM Family Study. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2006 Jul;132(7):729-733.
18. Wiertsema SP, Kirkham LA, Corscadden KJ, et al. Predominance of nontypeable Haemophilus influenzae in children with otitis media following introduction of a 3+0 pneumococcal conjugate vaccine schedule. *Vaccine* 2011; 29:5163-5170
19. Wiertsema SP, Chidlow GR, Kirkham LA, et al. High detection rates of nucleic acids of a wide range of respiratory viruses in the nasopharynx and the middle ear of children with a history of recurrent acute otitis media. *J Med Virol* 2011;83:2008–2017.
20. Selma P, Wiertsema, Karli J, Corscadden, Eva N, Mowe, Shyan Vijayasekaran, Harvey L, Coates, Timothy J, Mitchell, Wayne R, Thomas, Peter C, Richmond, Lea-Ann S, Kirkham. IgG Antibody Responses to Pneumococcal and Haemophilus influenzae Vaccine Candidate

- Proteins Are Not Impaired in Children With a History of Recurrent Acute Otitis Media. *Plos one*. November 2012 | Volume 7 | Issue 11 | e49061
21. Casey JR, Pichichero ME. Changes in frequency and pathogens causing acute otitis media in 1995-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004 Sep;23(9):824-828.
 22. Pichichero ME, Casey JR, Hoberman A, Schwartz R. Pathogens causing recurrent and difficult-to-treat acute otitis media, 2003-2006. *Clin Pediatr (Phila)*. 2008 Nov;47(9):901-906.
 23. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, Tyler R, Smith A, Findlay R, et al. Community-wide vaccination with the heptavalent pneumococcal conjugate significantly alters the microbiology of acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004 Sep;23(9):829-833.
 24. Pichichero ME, Kaur R, Casey JR, Sabirov A, Khan MN, Almudevar A. Antibody response to *Haemophilus influenzae* outer membrane protein D, P6, and OMP26 after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Vaccine*. 2010 Oct 18;28(44):7184-7192.
 25. Wiertsema SP, Leach AJ. Theories of otitis media pathogenesis, with a focus on Indigenous children. *Med. J. Aust.* 2009 Nov 2;191(9 Suppl):S50-54.
 27. Hotomi M, Yamanaka N, Saito T, Shimada J, Suzumoto M, Suetake M, et al. Antibody responses to the outer membrane protein P6 of non-typeable *Haemophilus influenzae* and pneumococcal capsular polysaccharides in otitis-prone children. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(6):703-707.
 28. Kaur R, Casey JR, Pichichero ME. Serum antibody response to three non-typeable *Haemophilus influenzae* outer membrane proteins during acute otitis media and nasopharyngeal colonization in otitis prone and non-otitis prone children. *Vaccine*. 2011 Jan 29;29(5):1023-1028.
 29. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003;57:677-701.
 30. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Feb;2(2):114-122.
 31. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*. 2006 Jul 12;296(2):202-211.
 32. Homøe P, Bjarnsholt T, Wessman M, Sørensen HCF, Johansen HK. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009 Oct;266(10):1533-1538.
 33. Coates H, Thornton R, Langlands J, Filion P, Keil AD, Vijayasekaran S, et al. The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Jun;138(6):778-781.
 34. Ruth B, Thornton Paul J, Rigby, Selma P, Wiertsema, Pierre Filion, Jennifer Langlands, Harvey L. Coates, Shyan Vijayasekaran, Anthony D. Keil and Peter C. Richmond. Multi-species bacterial biofilm and intracellular infection in otitis media. *BMC Pediatr.* 2011 Oct 24;11(1):94.
 35. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 2006 Feb 21;16(4):401-407.
 36. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007 Feb;10(1):52-56.
 37. Ruth B, Thornton, Selma P, Wiertsema, Lea-Ann S, Kirkham, Paul J, Rigby, Shyan Vijayasekaran, Harvey L. Coates, and Peter C. Richmond. Neutrophil Extracellular Traps And Bacterial Biofilms In Middle Ear Effusion Of Children With Recurrent Acute Otitis Media – A Potential Treatment Target.
 38. *Plos one* - <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0053837>