

Biofilme Bacteriano e Bactérias Intracelulares: O que Isso Significa Para o Otorrinolaringologista?

Ruth Thornton e Harvey Coates

Introdução

Historicamente, as infecções do trato respiratório superior tornaram-se menos importantes com o desenvolvimento da antibioticoterapia em meados do século passado. No entanto, a ideia de que eles erradicariam permanentemente muitas infecções otorrinolaringológicas não se tornou realidade. As infecções crônicas, como otite média com efusão (OME) de longa duração, a otite média supurativa crônica (OMSC), a sinusite crônica e as infecções crônicas das tonsilas palatinas costumam ser refratárias a tratamentos antibióticos sistêmicos e tópicos.

Apesar da existência de antibióticos excelentes para infecções agudas, os desafios permanecem e incluem estratégias terapêuticas para as condições acima. Estudos demonstraram que o biofilme bacteriano e a presença de bactérias intracelulares podem representar uma estratégia bacteriana de preservação para impedir a erradicação por antibióticos, sejam sistêmicos ou tópicos, ou pelo sistema imune do hospedeiro. É essa relação entre infecções crônicas do trato respiratório superior, biofilmes bacterianos e bactérias intracelulares que iremos abordar neste capítulo.

Biofilmes bacterianos

Os biofilmes bacterianos são definidos de maneira simples como grupos de bactérias incorporadas a uma matriz polimérica com resistência aumentada aos antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, se comparados a seus pares “planctônicos” ou de “vida livre”¹. Os biofilmes estão envolvidos em mais de 80% de todas as infecções microbianas humanas², inclusive as naturais e causadas por dispositivos. Elas incluem, entre outras, infecções do trato urinário, fibrose cística, periodontite e infecções causadas por dispositivos como válvulas protéticas cardíacas, cateteres venosos centrais e lentes de contato³. Os tecidos humanos são superfícies que atraem os biofilmes devido à sua natureza homeostática e à abundância de nutrientes simples⁴. Está cada vez mais claro que as características dos biofilmes se assemelham a muitas infecções crônicas e / ou recorrentes que ainda não tiveram sua patogênese definida de maneira satisfatória⁵. Os biofilmes em superfícies de mucosas são fisiologicamente diferentes dos formados nas superfícies inertes e são modulados por respostas imunes do hospedeiro, com células e proteínas do hospedeiro contribuindo para a composição da matriz⁶.

O desenvolvimento inicial do biofilme pode ocorrer sem sinais clínicos de infecção devido à retenção pela matriz de bactérias e toxinas associadas⁷.

Isso mascara os antígenos bacterianos impedindo a resposta inflamatória do hospedeiro^{8, 9}. O aumento da resistência aos antibióticos, a produção reduzida de fatores de virulência e a atividade diminuída dos neutrófilos facilitam o crescimento bacteriano por longos períodos¹⁰. As bactérias que formam o biofilme conseguem prolongar a infecção de maneira silenciosa e persistente, agindo como um reservatório para que quando o ambiente permitir e os mecanismos de defesa do hospedeiro não conseguirem contê-las, as bactérias planctônicas possam se dispersar⁷. São esses planctônicos ou agregados de bactérias que causam infecções clínicas agudas contra os quais os antibióticos são eficazes até o momento em que os êmbolos ou bactérias planctônicas se dispersam novamente^{4, 6,7,11,12}. Foi a erradicação das bactérias planctônicas, e a subsequente incapacidade de cultivar bactérias, que levou os clínicos e microbiologistas a pressupor que a infecção estivesse debelada, no entanto, a tecnologia PCR demonstrou a existência de bactérias, indicando que o reservatório subjacente da infecção ainda existia^{4,7}. As doenças clínicas agudas podem recidivar semanas ou meses mais tarde, tornando necessária a remoção cirúrgica do tecido ou a remoção e a substituição do dispositivo médico, se possível^{4,11,12}, ou a antibioticoterapia de longo prazo, como nos pacientes com fibrose cística⁴.

As bactérias dos biofilmes são de 10 a 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias planctônicas geneticamente idênticas^{13, 14}. Isso acontece através da excreção de substâncias antimicrobianas como as β -lactamases na matriz polimérica protetora extracelular ou através da troca rápida de material genético, inclusive genes de resistência aos antibióticos. Quando presentes no ambiente intracelular, as bactérias também são bastante protegidas de muitos dos antibióticos usados para tratar esses processos patológicos. É possível que isso ocorra por dois mecanismos: o primeiro é que elas são protegidas dos antimicrobianos com pouca capacidade de penetração intracelular e o segundo é que é provável que elas adotem o fenótipo de biofilme nesses nichos.

Quando presentes nos biofilmes, as bactérias são também mais resistentes às defesas do hospedeiro. Essas células são protegidas contra fagocitose, extermínio pelo complemento e opsonização, deposição de anticorpos e contra células imunes^{13, 14}. Em muitos casos, acredita-se que os próprios biofilmes não sejam altamente patogênicos, mas que as respostas imunes mal direcionadas e ineficazes possam resultar em inflamação grave e persistente, causando lesões colaterais aos sítios¹³.

Biofilme e otite média (OM)

Os estudos iniciais de imagens para analisar o envolvimento do biofilme na OM foram realizados no modelo chinchila de OM¹⁵. Os estudos mais recentes demonstraram biofilme bacteriano em crianças, principalmente pelo uso de técnicas não específicas de imagens incluindo colorações SEM e LIVE/DEAD combinadas com microscopia confocal por varredura laser. Demonstramos pela primeira vez o **biofilme em biópsia de orelha média de uma criança com OMSC** em 2004¹⁶; mas recentemente, Hall-Stoodley et al. demonstraram **biofilme em um grupo de crianças com OMA recorrente (OMAr) e OME crônica**¹⁷. Foram observados biofilmes de *S. aureus* nas biópsias de oito entre 10 adultos

com OMSC¹⁸ e em seis de 10 biópsias de orelha média de adultos com OMSC, através das colorações LIVE/DEAD e SEM¹⁹. Outro estudo recente realizado por Saunders et al. usou o SEM para demonstrar que um número pequeno de pacientes com colesteatoma (3 de 5) e apenas 1 entre 7 pacientes com OMSC tinham alguma evidência de biofilme²⁰. Esses estudos são todos limitados e as espécies bacterianas foram identificadas apenas em um subgrupo de crianças. Um estudo realizado na Groelândia encontrou evidências de biofilme em esfregaços de fluido de orelha média de crianças com OMSC, mas não encontraram evidências em crianças com OME crônica¹⁸. Até hoje, a maioria dos estudos (exceto o de Hall-Stoodley et al.¹⁷) limitaram suas análises a um único microorganismo no biofilme da OM, enquanto biofilmes de múltiplas espécies são observados com frequência em outros processos patológicos.

Os biofilmes também foram observados nas adenóides de crianças propensas a otite usando SEM²¹, coloração de viabilidade LIVE/DEAD^{22,23} e FISH específico para espécie²¹. Crianças com OMAr costumam ter maior cobertura de biofilme do que aquelas com OME (97,6% versus 27,7%)²⁴. FISH demonstrou que os biofilmes presentes contêm patógenos de OM e são frequentemente polimicrobianos²¹. Foram evidenciados grupos bacterianos nas células epiteliais do hospedeiro²¹. Acredita-se que a remoção desse reservatório leve a melhor resolução e diminua a recidiva de OMA após uma adenoidectomia²¹.

Infecção intracelular

Outro mecanismo da infecção bacteriana persistente e recidivante pode ser o **sequestro intracelular de patógenos. Quando se tornam intracelulares, os microorganismos podem iludir as respostas imunes do hospedeiro, e várias terapias antimicrobianas que não penetram bem na membrana celular.** Os vírus, bactérias e parasitas conseguem usar a infecção intracelular para escapar das respostas imunes do hospedeiro e persistir no organismo.

Infecção intracelular na otite média (OM)

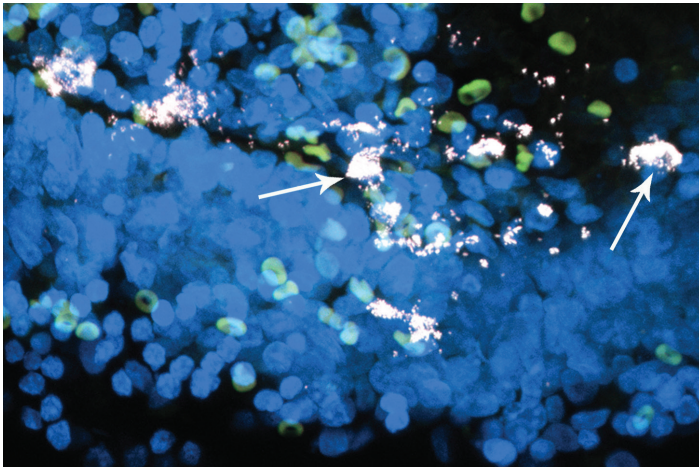
Há poucas evidências de persistência bacteriana intracelular em doenças crônicas e recidivantes de mucosas, como a otite média (OM). No entanto, dados *in vivo* e *in vitro* sugerem que os otopatógenos conseguem invadir e sobreviver dentro das células, embora os mecanismos para tanto não estejam bem caracterizados. A capacidade das bactérias de invadir células epiteliais pode ser uma estratégia útil para colonizarem o trato respiratório e impedirem o reconhecimento imune extracelular²⁵. Usando microscopia eletrônica de transmissão, já demonstramos infecção intracelular por cocos gram-positivos em 36% das biópsias de mucosa de orelha média de crianças com OME crônica²⁶. Esse foi o primeiro estudo a demonstrar que **a infecção intracelular do epitélio mucoso da orelha média pode estar associada à OME crônica. Acreditamos que a persistência intracelular contribua para a inflamação da orelha média e para a produção excessiva de muco, e crie um reservatório bacteriano levando à infecção recidivante.**

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* não-tipáveis (NTHi), *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são patógenos bem conhecidos associados à otite média recorrente e persistente e

todos são capazes de invadir e persistir nas células. A persistência intracelular não apenas permite a evasão de IgA secretora, IgG bactericida e defensinas²⁷, mas também protege as bactérias da ação dos antibióticos, sendo pois, um meio de evitar a depuração plasmática^{26,29}. Dentro das células epiteliais, as bactérias também estão protegidas contra certas classes de antibióticos, inclusive antibióticos β -lactâmicos^{29, 30} comumente usados no tratamento da OM.

Foi demonstrada a persistência intracelular de NTHi em várias condições clínicas, como doença pulmonar obstrutiva crônica³¹, adenóides de OMAr³²⁻³⁴ (**Figura 1**), bronquite crônica e fibrose cística³⁵. A NTHi é capaz de invadir e persistir nas células semelhantes aos macrófagos das adenóides de crianças com OMAr³²⁻²⁴ e em linhas celulares epiteliais e leucócitos *in vitro*²⁹. Assim como *H. influenzae* não-tipáveis, *M. catarrhalis* podem colonizar e existir no espaço intra ou extracelular do trato respiratório humano²⁵. Também foram observadas nas criptas da região intraepitelial, subepitelial ou no espaço intracelular das adenóides, em proximidade com macrófagos e células B nos folículos linfóides²⁷. Embora tenha sido antes considerado um patógeno extracelular, foi demonstrado que a *M. catarrhalis* invade as células epiteliais *in vitro* e parece induzir ativamente esse processo²⁷ por um mecanismo semelhante à macropinocitose²⁵.

Figura 1: Imagem de microscopia confocal de varredura laser de adenóide de uma criança com OMA recidivante e OMF crônica. A criança havia sido submetida à colocação de tubos de ventilação bilaterais e adenotonsilectomia. A biópsia foi hibridizada com sondas de oligonucleotídeos marcadas com fluorescência, específicas para *M. catarrhalis* (verde), *S. pneumoniae* (branco) e uma sonda bacteriana universal (EUB338). Os núcleos da célula hospedeira foram contra-corados com Hoechst 33342 e podem ser vistos em azul. Esta imagem mostra os *S. pneumoniae* (branco no envoltório) tanto intracelulares (setas) como entremeados por todo o tecido, principalmente próximo a uma cripta.



Já foram observados *S. aureus* internalizados em fagócitos em alguns pacientes com rinossinusite e nas células das tonsilas palatinas de crianças com tonsilite recidivante³⁶. Da mesma forma, já foi demonstrado que a *P. aeruginosa* também invade e persiste nas células embora com variações evidentes entre as

cepas³⁶. Está claro que as cepas isoladas da nasofaringe produzem menos cápsulas do que as isoladas do sangue e são mais propensas à formação de biofilme³⁸. Os *S. pneumoniae* podem penetrar e persistir em linhas celulares respiratórias, em sistemas *in vitro*, embora essa habilidade seja reduzida na presença de cápsulas de polissacarídeos³⁹, que são um fator importante de virulência dessas bactérias e que as protege da fagocitose⁴⁰.

Biofilme em rinossinusite crônica (RSC)

Muitos estudos demonstraram uma **alta incidência de biofilme bacteriano em pacientes com RSC e que são encontrados em 30% a 100% dos pacientes estudados**⁴¹. Também foram demonstradas taxas mais altas de biofilme nas adenóides de pacientes com RSC, quando comparados a controles com apneia obstrutiva do sono⁴². Embora seu papel na fisiopatologia da doença ainda não esteja totalmente elucidado, sugere-se que o biofilme tenha um importante papel nessa condição multifatorial⁴³. Embora a gravidade da doença e a resposta cirúrgica não pareçam estar diretamente relacionadas à presença ou ausência de biofilme em pacientes com RSC, elas estão relacionadas à microbiologia e à quantidade / morfologia de biofilmes presentes^{43, 44}. Quando estudados por Li et al., que classificaram os biofilmes bacterianos, os pacientes cujas amostras da mucosa sinusal receberam classificação mais alta, através de exames por imagem, tinham RSC clinicamente mais grave usando: 1) teste-20 de desfecho sino-nasal (SNOT-20), 2) escore endoscópico e 3) duração dos sintomas⁴³. Essas diferenças não foram aparentes quando foram considerados apenas pela presença ou ausência de biofilme⁴³.

Os padrões patológicos da RSC e a resposta cirúrgica também parecem relacionar-se às diferenças observadas na espécie bacteriana presente nos biofilmes⁴³. O *H. influenzae* presente em biofilmes de microorganismo único costuma ser encontrado em pacientes com doença mais leve que responde bem ao tratamento cirúrgico, onde a mucosa normal é obtida pouco tempo após a cirurgia⁴³. No entanto, **a *P. aeruginosa* e o *S. aureus* estão relacionadas a infecções mais graves que são resistentes à cirurgia**^{41, 43, 44}. **Além disso, os pacientes com *S. aureus* em seus biofilmes costumam evoluir mal em relação a escores de sintomas e qualidade de vida**, além de terem diferenças importantes nos escores de nasoendoscopia⁴⁴. Os estafilococos coagulase negativa costumam ser obtidos de pacientes com RSC, no entanto não foram relacionados à pior evolução clínica da doença e é possível que representem mais um contaminante do que um patógeno^{41, 46}. A presença de biofilmes polimicrobianos tem efeitos adversos na gravidade da doença, tanto no pré quanto no pós-operatório, e os pacientes necessitam de mais consultas pós-operatórias⁴⁴. Parece haver diferenças histológicas⁴⁷ e microbiológicas^{47, 48} entre RSC em adultos e crianças. Como a maioria dos estudos foi realizada com adultos, isso pode ter um efeito na aplicação dos achados de uma faixa etária para a outra e estudos futuros deveriam pensar em incluir coortes de pacientes pediátricos.

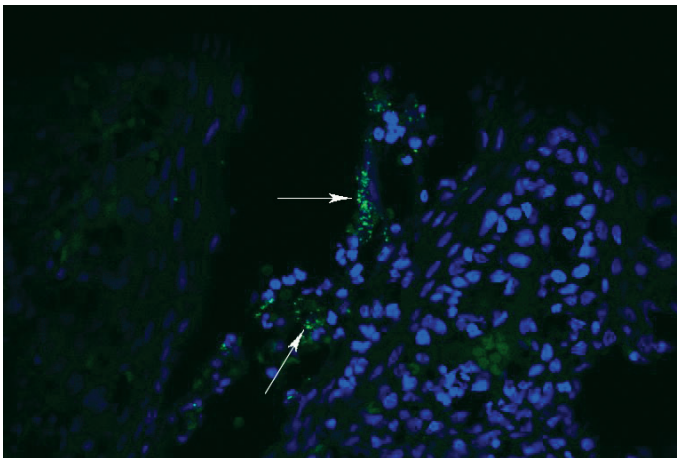
Tonsilite crônica e recidivante

A tonsilite aguda parece responder bem aos antibióticos, no entanto o efeito deles na doença recidivante parece ser limitado. Muitos dos tratamentos

prescritos para crianças com tonsilite não conseguem erradicar totalmente os microorganismos, portanto, persistindo o transporte de *S. pyogenes*⁴⁹. Foi demonstrado que mais de três quartos das tonsilas removidas por tonsilite recidivante parecem abrigar bactérias que produzem β -lactamases capazes de oferecer resistência aos antibióticos β -lactâmicos⁵⁰⁻⁵³. Elas também foram observadas livres no tecido tonsilar⁵⁴. A resposta ao tratamento inicial com antibióticos e a ausência de um efeito na recidiva da doença podem estar relacionados à persistência das bactérias no biofilme ou no espaço intracelular. Portanto, a remoção dos focos purulentos crônicos e das bactérias sequestradas ainda é o principal benefício da tonsilectomia⁵⁵.

Os biofilmes bacterianos com microorganismos gram-positivos e gram-negativos **foram demonstrados** pela primeira vez **nas criptas amigdalíanas de pacientes com tonsilite recidivante e apneia obstrutiva do sono** por Chole e Faddis em 2003⁵⁶. Também foram demonstrados nas tonsilas de 70,8% das crianças com tonsilite recorrente através de microscopia eletrônica por varredura^{23, 57} e microscopia confocal de varredura laser combinadas com coloração LIVE/DEAD, e coloração com Concanavalina A para demonstrar a matriz do biofilme²³. **Mesmo quando os pacientes com amigdalite crônica e recidivante não apresentam sintomas clínicos de infecção, a maioria das adenóides e tonsilas têm evidência de infecções purulentas ou bactérias infiltrativas difusas**⁵⁵ (Figura 2).

Figura 2: tonsila de uma criança submetida à adenotonsilectomia devido à tonsilite aguda recidivante e apneia obstrutiva do sono. O corte da tonsila foi hibridizado com uma sonda bacteriana universal (verde) e contra-corado com Hoechst 3342 (azul) antes do exame por imagem com microscopia confocal de varredura laser. A imagem mostra evidências de biofilme bacteriano (setas) na cripta tonsilar.



Os padrões infecciosos parecem diferir com a idade, com a infiltração bacteriana difusa observada mais em lactantes e diminuindo após os quatro anos de idade, após o que se observa um aumento em fissuras e criptas⁵⁵. Essas fissuras e bactérias infiltrativas difusas já não estão presentes em pacientes acima de 25

anos, onde apenas pontos de aderência e comunidades na cripta são evidentes⁵⁵. Um estudo observou a presença de *H. influenzae* em taxas mais altas em lactentes, que estavam localizados difusamente através do tecido. Essas bactérias não estavam presentes em adultos onde os *Streptococcus* spp. predominaram⁵⁵. Em um grupo de pacientes mais velhos, o *S. aureus* foi a espécie predominante em pacientes com tonsilite recidivante, enquanto o *S. pyogenes* foi mais prevalente em pacientes com abscesso peritonsilar³⁶. No entanto, e muito importante, quase todos os *S. aureus* estavam localizados no espaço intracelular de células tonsilares e 80% dos pacientes tinham infecções polimicrobianas³⁶. Quando testados *in vitro*, todas as cepas de *S. aureus* isoladas de tonsilite recidivante foram suscetíveis à clindamicina, que já foi usada com sucesso para erradicar cepas de *S. pyogenes* envolvidas em infecções recidivantes³⁶. **Nas tonsilites crônicas ou recidivantes com dor de garganta crônica, halitose e tosse para eliminar os resíduos da cripta, os resíduos (caseum tonsilares) são uma combinação de alimento não digerido e bactérias, inclusive *Actinomyces* sp. Se uma massagem suave não resolver o problema, a solução é a remoção cirúrgica das tonsilas.**

Quais são as implicações do biofilme e da persistência intracelular na prática clínica?

Parece que o equilíbrio entre a infecção intracelular e a formação de biofilme é responsável pela persistência e recidiva da doença em um grupo suscetível de crianças. Enquanto esforços estão sendo feitos para tratar o biofilme nessas doenças, **a persistência intracelular também deve ser considerada.**

Os tratamentos atuais para OMA com antibióticos β-lactâmicos (inclusive amoxicilina-clavulanato e cefalosporinas) podem ser menos eficazes para erradicar a persistência bacteriana e para tratar a causa subjacente dessas condições porque não penetram na célula. Antibióticos como macrolídeos, cetolídeos e fluoroquinolonas, que penetram e se concentram dentro da célula, podem ser mais úteis. Um estudo realizado por Courter et al., no entanto, indicou que **são observadas mais falhas clínicas quando as crianças com OMA são tratadas com macrolídeos quando são comparadas com aquelas que receberam amoxicilina ou amoxicilina-clavulanato**⁵⁸. Essa diferença pode refletir a maior resistência bacteriana aos macrolídeos comparados aos β-lactâmicos⁵⁸. Isso também foi observado em estudos israelenses onde a **amoxicilina-clavulanato se mostrou superior à azitromicina para erradicar patógenos bacterianos da efusão da orelha média**⁵⁹. Esses achados podem refletir as diferenças nos patógenos-alvo. Os antibióticos β-lactâmicos ainda podem ser mais eficazes no tratamento de bactérias na fase planctônica aguda, enquanto os macrolídeos podem ter um papel importante em atingir o sequestro bacteriano intracelular subjacente. Isso, no entanto, deve ser mais estudado porque algumas evidências de estudos *in vitro* sobre a infecção por *P. aeruginosa* de uma linhagem de célula epitelial sugerem que as bactérias dentro da célula adotam um fenótipo de biofilme e conseqüentemente são insensíveis aos efeitos dos antibióticos³⁷. Pode ser importante considerar o uso de uma combinação deles para melhorar a eficácia do tratamento, embora isso venha a requerer estudos clínicos para sua determinação.

Os antibióticos macrolídeos também podem afetar o transporte nasofaríngeo como demonstrado em estudo recente por Morris et al., onde o tratamento de crianças nativas com OMA com uma única dose de azitromicina reduziu o estado de portador nasal da *S. pneumoniae* e de *H. influenzae* não tipável, se comparadas a crianças tratadas com amoxicilina por sete dias⁶⁰. Sabe-se que na nasofaringe de crianças nativas, 36% dos microorganismos existem em estado não cultivável, mas que pode ser detectado por PCR⁶¹. Não está claro se estão presentes na formação de biofilme ou localizam-se no espaço intracelular. Pode ser que esses patógenos consigam persistir dentro das células da nasofaringe e que a mudança de antibiótico possa reduzir o transporte dos patógenos para o espaço nasofaríngeo e possivelmente aqueles sequestrados de forma semelhante na orelha média. Considerando os resultados que demonstram a presença de patógenos tanto dentro das células como em biofilmes, é possível que para tratar eficazmente essa condição, as combinações de antibióticos terão que ser usadas em conjunto com outros tratamentos para atingir os dois mecanismos de persistência.

A terapêutica futura terá que envolver tratamentos combinados que provavelmente incluirão antimicrobianos capazes de atingir os patógenos dentro e fora das células, mecanismos que interferem com a comunicação bacteriana necessária para a formação e manutenção do biofilme^{41, 62} e novas terapias não tóxicas para a mucosa que rompem diretamente os biofilmes⁴¹. Os macrolídeos ou as quinolonas podem ser úteis como parte dessas combinações e merecem outras pesquisas porque não apenas atingem patógenos intracelulares como inibem o *quorum sensing* e reduzem a resposta inflamatória do hospedeiro⁶³. No entanto, a mudança de qualquer tratamento para atingir esses mecanismos de persistência terá que ser monitorada de perto porque a erradicação menos que completa do biofilme pode estimular a sua proliferação e agir para aumentar a inflamação da mucosa e a gravidade clínica da doença⁴¹.

Colocação de tubo de ventilação com ou sem adenoidectomia?

A maioria dos casos de OME resolve-se espontaneamente e a terapia com antibióticos parece ter eficácia limitada⁶⁴. Quando a OME persiste por quatro meses ou mais, os tubos de ventilação podem ser inseridos dependendo do estado auditivo, do risco de desenvolvimento da criança e / ou do dano estrutural à membrana timpânica ou à orelha média⁶⁴. Para crianças acima de um ano de idade que já receberam tubos de ventilação, a adenoidectomia complementar pode ser adequada⁶⁴. Se a OMAr for superposta à OME não resolvida, a terapêutica sugerida envolve a inserção de tubo de ventilação como tratamento principal⁶⁵. Embora isso pareça ser eficaz no curto prazo, quase um terço das crianças vai necessitar de reinserção dos tubos de ventilação para recidiva de OME e subsequente perda de audição, ou para OMAr⁶⁶.

Existe uma discussão sobre se a adenoidectomia além da inserção de tubos de ventilação deveria ser usada como tratamento principal em crianças com OMAr e / ou OME crônica. Não está claro se **a adenoidectomia funciona devido à remoção de uma obstrução mecânica da tuba auditiva ou à remoção de um reservatório de microorganismos patogênicos^{67, 68}.**

Só um estudo considerou a mudança no estado de portador nasofaríngeo

após adenoidectomia com inserção de tubo de ventilação e demonstrou que a colonização de *H. influenzae* ou *M. catarrhalis* não foi afetada, no entanto, a colonização por *S. pneumoniae* aumentou⁶⁹. Sabe-se que a adenóide pode abrigar muitos dos otopatógenos conhecidos e **a adenoidectomia costuma melhorar a resolução da doença e diminuir a recidiva de OMA**²¹. Na literatura, um estudo não encontrou diferença no tempo que a efusão levava para desaparecer da orelha média quando se comparou crianças com OME submetidas apenas a inserção de tubo de ventilação com crianças submetidas a adenoidectomia mais a inserção de tubo de ventilação durante 36 meses de acompanhamento⁶⁷. Outros ensaios clínicos com alocação aleatória e controlados indicaram que **a adenoidectomia é mais eficaz para o tratamento de OME crônica em crianças maiores, enquanto a inserção do tubo de ventilação é mais recomendada para crianças menores**⁶⁷. Um estudo com uma grande população foi feito na Austrália Ocidental incluindo 51.373 crianças abaixo de 10 anos de idade submetidas à inserção de tubo de ventilação entre 1981 e 2004⁶⁸. A adenoidectomia ou adenotonsilectomia na época da primeira ou subsequente inserção do tubo de ventilação foi associada a 57% e 28% (respectivamente) menos risco de cirurgia para outra inserção do tubo de ventilação, se comparadas apenas à inserção do tubo de ventilação⁶⁸. Como aproximadamente um terço das crianças será submetido a mais de um procedimento para inserção do tubo de ventilação, **as baixas taxas de complicações da adenoidectomia e o curto período de internação podem indicá-la como um complemento da inserção do tubo de ventilação e pode representar uma opção econômica de tratamento de primeira linha para OME crônica**⁶⁸. É contraditório que embora haja taxas altas de OMAr e OME em crianças nativas, parece haver relutância em realizar cirurgia faríngea adicional no momento da inserção do tubo de ventilação. Não está claro se isso é devido à diferença na patogênese da doença ou se é resultado de problemas de acesso⁶⁸. No estudo populacional da Austrália Ocidental, muitas crianças tiveram suas adenóides ou tonsilas palatinas removidas juntamente com a primeira ou segunda inserção de tubo de ventilação, e a OME crônica foi a única indicação; isso pode refletir a preocupação crescente em atingir a etiologia subjacente⁶⁸. São necessárias estratégias alternativas de tratamento para reduzir a necessidade de reinserção de tubos de ventilação em crianças com OMAr e OME crônica.

Tratamento de OM supurativa crônica - por que lavar as orelhas ao invés de usar porta algodão?

A OMSC na população aborígine australiana ainda é um grande problema, com incidência entre 15-24%^{70,71}, bem acima do nível da OMS de 4%, indicando um grande problema de saúde pública⁷². **O tratamento da OMSC na Austrália varia de acordo com o estado, principalmente entre a Austrália Ocidental e o Território do Norte**. O tratamento recomendado inclui tratamento com higiene da orelha (toalete aural), medicações ototópicas e possivelmente antibióticos sistêmicos⁷³. Nas crianças aborígenes da **Austrália Ocidental com OMSC, a lavagem suave da orelha comprometida pela otorrêia crônica com seringa e solução de iodo-povidona a 0,5%, seguida de ciprofloxacina tópica** se mostrou eficaz no nível de comunidade para atingir até 64% de cura da OMSC⁷⁴. Essas

taxas são até três vezes mais altas do que as observadas em crianças tratadas com aminoglicosídeos, recomendados anteriormente⁷⁵. Essas taxas são semelhantes às observadas no tratamento de OMSC com limpeza do ouvido e irrigação em uma população coreana⁷⁶.

As comparações entre ciprofloxacina tópica e Sofradex® (framicetina-gramicidina-dexametasona) em crianças nativas do Território do Norte mostraram baixas taxas de melhora ou cura de OMSC persistente, independentemente da terapia de escolha⁷⁷. A otorreia não se resolveu em 70% das crianças e a intensidade da secreção não melhorou em mais de 50% delas⁷⁷. Dentre um terço das crianças que obtiveram ouvidos secos ao final do período de intervenção, muitas recidivaram antes do final do ano letivo demonstrando a baixa taxa de cura nessa população⁷⁷. As taxas são muito diferentes entre os estados apesar do uso da mesma **ciprofloxacina tópica**. A principal diferença entre os estados é a **limpeza do ouvido antes de instilar as gotas tópicas. No Território do Norte, pratica-se a secagem com um porta algodão enrolado com um tecido fino na ponta, para absorver a secreção,**⁷⁷ **ao contrário da higiene com a lavagem do ouvido com a iodo-povidona na Austrália Ocidental. Isso pode ser responsável por algumas diferenças nas taxas de sucesso entre as crianças se a perfuração for bloqueada e os antibióticos tópicos não conseguem atingir o local da infecção**⁷⁸. Por outro lado, pode ser que assim como o observado em infecções ortopédicas por biofilme, a irrigação de qualquer solução seja melhor do que nenhuma irrigação para reduzir o número de microorganismos, no entanto **a irrigação com surfactante é melhor do que apenas com soro fisiológico ou antibióticos**⁷⁹.

A presença de biofilme e infecção intracelular com otopatógenos conhecidos na mucosa da orelha média de crianças nativas com OMSC pode ajudar a explicar as eficácias diferentes de tratamento entre a ciprofloxacina (uma fluoroquinolona) e a framicetina-gramicidina-dexametazona (Sofradex® – um aminoglicosídeo). Um estudo de Couzos et al. demonstrou que a ciprofloxacina é mais eficaz para se atingir a cura de OMSC em nível de comunidade do que os aminoglicosídeos tópicos⁷⁴. Essas diferenças podem ser causadas pela habilidade das fluoroquinolonas de penetrar nas células e atingir patógenos sequestrados. A ineficácia comparativa dos aminoglicosídeos tópicos pode estar relacionada à indução associada de formação de biofilme⁸⁰. Enquanto a indução da formação de biofilme pelos aminoglicosídeos foi demonstrada para a *P. aeruginosa*, esse efeito não considerou outros otopatógenos. A capacidade dos antibióticos de induzir formação de biofilme em alvos bacterianos deve ser levada em consideração ao tratar processos crônicos ou recidivantes da doença. Embora essas diferenças entre tratamentos com ciprofloxacina e Sofradex® não tenham sido observadas em um estudo realizado por Leach et al.⁷⁷, isso pode refletir as diferenças na **toaleta aural antes do tratamento tópico**. Estudos no modelo chinchila de OM indicaram que **a lavagem do espaço da orelha média resulta na remoção do biofilme da superfície da mucosa**⁶¹. É possível que **a toaleta aural das crianças** antes do tratamento no estudo de Couzos⁷⁴ **tenha reduzido a carga de biofilme e tenha permitido a penetração e ação ideais dos antibióticos**. As gotas tópicas de aminoglicosídeos

já não são aconselhadas quando houver perfuração da membrana timpânica devido a problemas de ototoxicidade⁸². São necessários estudos comparando a toaleta aural mais ciprofloxacina com a secagem e ciprofloxacina.

Conclusões

Os biofilmes bacterianos e as infecções intracelulares têm um papel importante na cronicidade de várias infecções crônicas do trato respiratório superior. Atualmente, a remoção mecânica do biofilme, a remoção do órgão (no caso de tonsilite crônica) ou a terapia específica com antibióticos são as melhores opções de tratamento. Os tratamentos futuros incorporando os agentes dirigidos a patógenos intracelulares em combinação com novos agentes que dispersam os biofilmes poderão estabelecer uma terapia mais específica para erradicar as bactérias dentro dos biofilmes e das células.

Referências bibliográficas

1. Burmolle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homoe P, Tvede M, Nyvad B, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Moser C, Kirketerp-Moller K, Johansen HK, Hoiby N, Jensen PO, Sorensen SJ, Bjarnsholt T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59(3):324-36.
2. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2(2):114-22.
3. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2):167-93.
4. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003; 112(10):1466-77.
5. Furukawa S, Kuchma SL, O'Toole GA. Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J Bacteriol*. 2006; 188(4):1211-7.
6. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 12(3):185-90.
7. Heinzlmann M, Herzig DO, Swain B, Mercer-Jones MA, Bergamini TM, Polk HC, Jr. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997; 4(6):705-10.
8. Fulcher TP, Dart JK, McLaughlin-Borlace L, Howes R, Matheson M, Cree I. Demonstration of biofilm in infectious crystalline keratopathy using ruthenium red and electron microscopy. *Ophthalmology*. 2001; 108(6):1088-92.
9. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Maragoudakis P, Tzagaroulakis A, Ferekidis E. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they? *Laryngoscope*. 2007; 117(4):668-73.
10. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol*. 2006; 296(2- 3):149-61.

11. Kobayashi H. Airway biofilm disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 17(5):351-6.
12. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 236(2):163-73.
13. Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 15(5):347-51.
14. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009; 11(7):1034-43.
15. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, Daigle BJ, Ehrlich MD, Post JC. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *Jama*. 2002; 287(13):1710-5.
16. Coates H. Chronic suppurative otitis media without cholesteatoma. In: Alper C, Bluestone, C., Dohar, J., Madel, E. & Casselbrant, M., editor. *Advanced Therapy of Otitis Media*. Hamilton, Ontario: B.C. Decker Incorporated; 2004. p. 299-305.
17. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodley P, Post JC, Ehrlich GD, Kerschner JE. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *Jama*. 2006; 296(2):202-11.
18. Homoe P, Bjarnsholt T, Wessman M, Sorensen HC, Johansen HK. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009.
19. Lee MR, Pawlowski KS, Luong A, Furze AD, Roland PS. Biofilm presence in humans with chronic suppurative otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 141(5):567-71.
20. Saunders J, Murray M, Alleman A. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: scanning electron microscopy findings. *Am J Otolaryngol*. 2009.
21. Hoa M, Tomovic S, Nistico L, Hall-Stoodley L, Stoodley P, Sachdeva L, Berk R, Coticchia JM. Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009; 73(9):1242-8.
22. Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Dorpmans E, Struik J, Huy PT, Hiemstra P, Bloemberg GV, Grote JJ. Characterization of Mucosal Biofilms on Human Adenoid Tissues. *Laryngoscope*. 2007.
23. Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Huy PT, Hiemstra PS, Bloemberg GV, Grote JJ. Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 133(2):115-21.
24. Hoa M, Syamal M, Schaeffer MA, Sachdeva L, Berk R, Coticchia J. Biofilms and chronic otitis media: an initial exploration into the role of biofilms in the pathogenesis of chronic otitis media. *Am J Otolaryngol*. 2009.
25. Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, Opitz B. *Moraxella catarrhalis* is

- internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol.* 2007; 9(3):694-707.
26. Coates H, Thornton R, Langlands J, Filion P, Keil AD, Vijayasekaran S, Richmond P. The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 138(6):778-81.
 27. Heiniger N, Spaniol V, Troller R, Vischer M, Aebi C. A reservoir of *Moraxella catarrhalis* in human pharyngeal lymphoid tissue. *J Infect Dis.* 2007; 196(7):1080-7.
 28. Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* 2007; 15(8):355-62.
 29. Kratzer C, Graninger W, Macfelda K, Buxbaum A, Georgopoulos A. Comparative activities of antibiotics against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Wien Klin Wochenschr.* 2007; 119(9-10):297-302.
 30. Mandell GL, Coleman EJ. Activities of antimicrobial agents against intracellular pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(9):2561-3.
 31. Murphy TF. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16(2):129-34.
 32. Forsgren J, Samuelson A, Ahlin A, Jonasson J, Rynnel-Dagoo B, Lindberg A. *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by in situ hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun.* 1994; 62(2):673-9.
 33. Forsgren J, Samuelson A, Borrelli S, Christensson B, Jonasson J, Lindberg AA. Persistence of nontypeable *Haemophilus influenzae* in adenoid macrophages: a putative colonization mechanism. *Acta Otolaryngol.* 1996; 116(5):766-73.
 34. Craig JE, Cliffe A, Garnett K, High NJ. Survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in macrophages. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 203(1):55-61.
 35. Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, Greenberg SB. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164(11):2114-9.
 36. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, Maletzki C, Kreikemeyer B, Pau HW, Podbielski A. Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS One.* 2010; 5(3):e9452.
 37. Garcia-Medina R, Dunne WM, Singh PK, Brody SL. *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73(12):8298-305.
 38. Henriques-Normark B, Normark S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp Cell Res.* 2010; 316(8):1408-14.
 39. Talbot UM, Paton AW, Paton JC. Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 1996; 64(9):3772-7.

40. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*. 2005; 73(8):4653-67.
41. Al-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011; 11(1):18-23.
42. Coticchia J, Zuliani G, Coleman C, Carron M, Gurrola J, 2nd, Hauptert M, Berk R. Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx: Chronic rhinosinusitis vs obstructive sleep apnea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 133(2):110-4.
43. Li H, Wang D, Sun X, Hu L, Yu H, Wang J. Relationship between bacterial biofilm and clinical features of patients with chronic rhinosinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011.
44. Singhal D, Foreman A, Bardy JJ, Wormald PJ. *Staphylococcus aureus* biofilms: Nemesis of Endoscopic Sinus Surgery. *Laryngoscope*. 2011; 121(7):1578-83.
45. Foreman A, Wormald PJ. Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. *Laryngoscope*. 2010; 120(8):1701-6.
46. Busaba NY, Siegel NS, Salman SD. Microbiology of chronic ethmoid sinusitis: is this a bacterial disease? *Am J Otolaryngol*. 2004; 25(6):379-84.
47. Chan KH, Abzug MJ, Coffinet L, Simoes EA, Cool C, Liu AH. Chronic rhinosinusitis in young children differs from adults: a histopathology study. *J Pediatr*. 2004; 144(2):206-12.
48. Slack CL, Dahn KA, Abzug MJ, Chan KH. Antibiotic-resistant bacteria in pediatric chronic sinusitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20(3):247-50.
49. Brook I. The role of beta-lactamase producing bacteria and bacterial interference in streptococcal tonsillitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 17(6):439-42.
50. Brook I, Yocum P, Friedman EM. Aerobic and anaerobic bacteria in tonsils of children with recurrent tonsillitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1981; 90(3 Pt 1):261-3.
51. Reilly S, Timmis P, Beeden AG, Willis AT. Possible role of the anaerobe in tonsillitis. *J Clin Pathol*. 1981; 34(5):542-7.
52. Tuner K, Nord CE. beta-Lactamase-producing anaerobic bacteria in recurrent tonsillitis. *J Antimicrob Chemother*. 1982; 10 Suppl A:153-6.
53. Kielmovitch IH, Keleti G, Bluestone CD, Wald ER, Gonzalez C. Microbiology of obstructive tonsillar hypertrophy and recurrent tonsillitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989; 115(6):721-4.
54. Brook I, Yocum P. Quantitative measurement of beta lactamase in tonsils of children with recurrent tonsillitis. *Acta Otolaryngol*. 1984; 98(5-6):556-9.
55. Swidsinski A, Goktas O, Bessler C, Loening-Baucke V, Hale LP, Andree H, Weizenegger M, Holzl M, Scherer H, Lochs H. Spatial organisation of microbiota in quiescent adenoiditis and tonsillitis. *J Clin Pathol*. 2007; 60(3):253-60.
56. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003; 129(6):634-6.

57. Al-Mazrou KA, Al-Khattaf AS. Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134(1):20-3.
58. Courter JD, Baker WL, Nowak KS, Smogowicz LA, Desjardins LL, Coleman CI, Giroto JE. Increased clinical failures when treating acute otitis media with macrolides: a meta-analysis. *Ann Pharmacother*. 2010; 44(3):471-8.
59. Dagan R, Johnson CE, McLinn S, Abughali N, Feris J, Leibovitz E, Burch DJ, Jacobs MR. Bacteriologic and clinical efficacy of amoxicillin/clavulanate vs. azithromycin in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19(2):95-104.
60. Morris PS, Gadil G, McCallum GB, Wilson CA, Smith-Vaughan HC, Torzillo P, Leach AJ. Single-dose azithromycin versus seven days of amoxycillin in the treatment of acute otitis media in Aboriginal children (AATAAC): a double blind, randomised controlled trial. *Med J Aust*. 2010; 192(1):24-9.
61. Smith-Vaughan H, Byun R, Nadkarni M, Jacques NA, Hunter N, Halpin S, Morris PS, Leach AJ. Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. *BMC Ear Nose Throat Disord*. 2006; 6:10.
62. Hentzer M, Eberl L, Nielsen J, Givskov M. Quorum sensing : a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs*. 2003; 17(4):241-50.
63. Imamura Y, Higashiyama Y, Tomono K, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Kadota J, Iglewski BH, Kohno S. Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(4):1377-80.
64. AAFP. Otitis media with effusion. 2004http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15121966
65. Rosenfeld RM, Bluestone C. Clinical efficacy of surgical therapy. In: Rosenfeld RMB, C., editor. *Evidence-Based Otitis Media*. Second Edition ed. Hamilton, London: BC Decker Inc.; 2003.
66. Coyte PC, Croxford R, McIsaac W, Feldman W, Friedberg J. The role of adjuvant adenoidectomy and tonsillectomy in the outcome of the insertion of tympanostomy tubes. *N Engl J Med*. 2001; 344(16):1188-95.
67. Casselbrant ML, Mandel EM, Rockette HE, Kurs-Lasky M, Fall PA, Bluestone CD. Adenoidectomy for otitis media with effusion in 2-3-year-old children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009; 73(12):1718-24.
68. Kadhim AL, Spilsbury K, Semmens JB, Coates HL, Lannigan FJ. Adenoidectomy for middle ear effusion: a study of 50,000 children over 24 years. *Laryngoscope*. 2007; 117(3):427-33.
69. Mattila PS, Hammaren-Malmi S, Saxen H, Kaijalainen T, Kayhty H, Tarkkanen J. Adenoidectomy and nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Arch Dis Child*. 2010.
70. Rothstein J, Heazlewood R, Fraser M. Health of Aboriginal and Torres Strait Islander children in remote Far North Queensland: findings of the Paediatric Outreach Service. *Med J Aust*. 2007; 186(10):519-21.

71. Morris PS, Leach AJ, Silberberg P, Mellon G, Wilson C, Hamilton E, Beissbarth J. Otitis media in young Aboriginal children from remote communities in Northern and Central Australia: a cross-sectional survey. *BMC Pediatr.* 2005; 5:27.
72. Mackenzie GA, Carapetis JR, Leach AJ, Morris PS. Pneumococcal vaccination and otitis media in Australian Aboriginal infants: comparison of two birth cohorts before and after introduction of vaccination. *BMC Pediatr.* 2009; 9:14.
73. Macfadyen CA, Acuin JM, Gamble C. Systemic antibiotics versus topical treatments for chronically discharging ears with underlying eardrum perforations. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; (1):CD005608.
74. Couzos S, Lea T, Mueller R, Murray R, Culbong M. Effectiveness of ototopical antibiotics for chronic suppurative otitis media in Aboriginal children: a community-based, multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Med J Aust.* 2003; 179(4):185-90.
75. Couzos S, Councillor H. Clinical need for ototopical fluoroquinolones outweighs miniscule risk of antibiotic resistance. *J Paediatr Child Health.* 2006; 42(4):223-4.
76. Choi HG, Park KH, Park SN, Jun BC, Lee DH, Yeo SW. The appropriate medical management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in chronic suppurative otitis media. *Acta Otolaryngol.* 2009:1-5.
77. Leach A, Wood Y, Gadil E, Stubbs E, Morris P. Topical ciprofloxin versus topical framycetin-gramicidin-dexamethasone in Australian aboriginal children with recently treated chronic suppurative otitis media: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(8):692-8.
78. Brook I. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy. *Anaerobe.* 2008; 14(6):297-300.
79. Anglen JO, Gainor BJ, Simpson WA, Christensen G. The use of detergent irrigation for musculoskeletal wounds. *Int Orthop.* 2003; 27(1):40-6.
80. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 2005; 436(7054):1171-5.
81. Leroy M, Cabral H, Figueira M, Bouchet V, Huot H, Ram S, Pelton SI, Goldstein R. Multiple consecutive lavage samplings reveal greater burden of disease and provide direct access to the nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm in experimental otitis media. *Infect Immun.* 2007; 75(8):4158-72.
82. Coates H. Ototoxic eardrops and tympanic membrane perforations: time for a change? *J Paediatr Child Health.* 2005; 41(8):401-4.