Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.1; 2015

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 3:06 +0330 on Sunday September 24th 2017

Frequency of Alloiococus Otitidis in Patients with Otitis Media by Culture and PCR Method

Nasrin Ebrahimi[1], Hossein Goudarzi[1]*, Mehdi Goudarzi[1], Arezoo Asadi[1], Tina Delsouz Bahri[1]

1. Msc Student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Full professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Assistance professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2015/9/20 Accept: 2015/12/19)

Abstract

Background: *In Iran vaccination with Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is performed on all newborns within the first days of life for prevention of tuberculosis. It is a live attenuated vaccine and produced from genetically different vaccine strains of Mycobacterium bovis. This vaccine is safe but local adverse reactions such as administration site abscess and lymphadenitis occur in some healthy children vaccinated with this vaccine as the most common side effect of BCG vaccination. Disseminated BCG infections are very rare in immunocompetent children but lymphadenitis is very common in Iran and other countries. It is indicated that the vaccine strain and it's genetically variations are correlated with these side effects. Therefore, in this study we aimed to analyze the genetic characterizations of vaccine strains used in Iran.*

Materials and Methods: *Thirty infants showing lymphadenitis induced by BCG vaccination were chosen for this study. After aspiration from the lesions, they were subjected to acid fast staining and culture on Lowenstein Jensen medium. Subsequently, DNA was extracted from samples using Phenol–chloroform method. The genus of the isolates was characterized by primer for 16sRNA gene. Then using RD1, RD14 and DU1 primers and in the next step RD9, RD4Deleted, RD4Present and RD1Deleted primers the species and strains of the isolates were characterized.*

Results: *Performing 16sRNA PCR, all 30 samples of acid fast bacilli were confirmed as Mycobacterium genus. Then using RD1, RD14, DU1, RD9, RD4 Deleted, RD4 Present and RD1 Deleted primers all isolates were detected as Mycobacterium bovis BCG strain Pasteur.*

Conclusion: *In this study all of the strains isolated from the patients were detected as Mycobacterium bovis BCG strain Pasteur. Therefore, the other possible factors causing BCG complications including BCG overdose, faulty intradermal technique, and disturbance of cellular immunity should be considered as the other risk factors of causing lesions.*

Keywords: *Mycobacterium bovis, BCG vaccine, Lymphadenitis, Tuberculosis, Infants.*

• *Corresponding authors: Dr Hossein Goudarzi, Department of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, e-mail: hgod100@yahoo.com*

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور۳۹، شماره ۱، ۱۳۹٤، صفحات ۳٦ تا ٤۰

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 3:06 +0330 on Sunday September 24th 2017

بررسی فراوانی الویوکوکوس اوتیتیدیس در افراد مبتلا به اوتیت میانی به روش کشت و PCR

نسرین ابراهیمی[۱]، حسین گودرزی*[۲]، مهدی گودرزی[۳]، ، آرزو اسدی[۱] ، تینا دلسوز بحری[۱]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۶/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: عفونت گوش میانی یکی از بیماری‌های شایع در میان کودکان است. عوامل مختلفی از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها عامل ابتلا به عفونت گوش میانی هستند. شایع‌ترین باکتری‌های پاتوژناستر پتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا، موراکسلاکاتارالیس و استرپتوکوکوس پیوژن هستند. به تازگی الویوکوکوس اوتیتیدیس به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده این عفونت شناخته شده است که مطالعه‌های محدودی به دلیل سخت رشد و کند رشد بودن و شرایط سخت نمونه گیری روی این باکتری صورت گرفته است. هدف از انجام این مطالعه تعیین فراوانی و جداسازی الویوکوکوس اوتیتیدیس از ترشحات گوش میانی کودکان مبتلا به اوتیت میانی به روش کشت و *PCR* است.

موادوروش‌ها: تحقیق به روش توصیفی انجام و تعداد ۶۰ نمونه از ترشحات عفونت گوش میانی از سوی پزشک متخصص جمع‌آوری شد. از میان نمونه‌های اتخاذ شده بخشی از حجم مایع گوش میانی برای کشت روی محیط کشت میکروبی تلقیح و بخشی دیگر برای انجام کارهای مولکولی استفاده شد. عفونت گوش با دو روش بررسی و با آزمون کای دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: از تعداد ۶۰ نمونه عفونت گوش میانی تعداد ۳ (۵درصد)نمونه به روش کشت شناسایی شد و با روش *PCR* ۲۸ (۴۶درصد) نمونه مثبت ارزیابی شدند(P<0/0001).

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد الویوکوکوس اوتیتیدیس یک باکتری سخت رشد ، کند رشد و یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت گوش میانی است. شناسایی الویوکوکوس به روش کشت بسیار دشوار است در حالی که *PCR* روش مناسب تری برای شناسایی این باکتری است.

واژگان کلیدی: کیتین، لیشمانیا ماژور، بارانگلی

مقدمه

عفونت گوش میانی (OtitisMedia(OM یکی از شایع ترین دلایل مراجعه کودکان به پزشک است(۱). التهاب گوش میانی (OtitisMedia) به دو زیر گروه اصلی التهاب حاد (acute otitis media)(AOM) و التهاب گوش میانی همراه با ترشحات Otitis Media With Effusion (OME) تقسیم می‌شود(۲, ۳) AOM. التهاب حاد در گوش میانی ایجاد می‌کند که باکتری‌ها و ویروس‌ها از عوامل مهم ایجاد کننده این عفونت هستند و یکی از مهم ترین دلایل تجویز آنتی بیوتیک در کودکان محسوب می‌شود. علائم اوتیت میانی شامل گوش درد، ترشح مایع ازگوش، ازدست دادن شنوایی، احساس پری گوش، درد وتب است.(۴-۷) اوتیت میانی با افیوژن (OME) التهاب گوش میانی به همراه ترشح مایع از شکاف گوش میانی (MEE) بدون علائم و نشانه‌های التهاب حاد است.

احتمال ابتلا به عفونت گوش میانی در کودکان به دلایلی بسیار بیشتر از بزرگسالان است. مانند کوتاه‌تر بودن شیپور استاش، غیر طبیعی بودن و نقص فیزیولوژیک در شیپور استاش یا کامل نبودن سیستم ایمنی در نوزادان و کودکان که یکی از مهم ترین عوامل ابتلای نوزادان به عفونت گوش میانی است.

نویسنده مسئول: دکتر حسین گودرزی، استادگروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی،تهران، ایران.
hgod100@yahoo.com

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 3:06 +0330 on Sunday September 24th 2017

در کودکانی که سابقه ابتلا به عفونت دستگاه تنفسی فوقانی را دارند مانند عفونت‌های ویروسی باعث تجمع ترشحات موکوسی بینی، نازوفارنکس در باریکه شیپور استاش و باعث مسدود شدن شیپور استاش و ایجاد فشار منفی در گوش می‌شود و این ترشحات چون راهی برای خروج ندارند در همان منطقه تجمع پیدا می‌کنند و مکان مناسبی برای تجمع و رشد باکتری‌ها و ویروس‌ها فراهم می‌شود.(۸) باکتری‌هایی که در ابتلا به عفونت گوش‌میانی نقش دارند شامل هموفیلوس آنفوانزا، استرپتوکوک پنومونیه ، موراکسلا کاتارالیس هستند. به تازگی در برخی مطالعات باکتری گرم مثبتی به نام الویوکوکوساوتیتیدیس به عنوان یک پاتوژن شایع درابتلابه عفونت گوش میانی معرفی شده است.(۹)

نخستین بار در سال ۱۹۸۹از سوی Faden و Dryja کوکسی گرم مثبت ناشناخته‌ای از عفونت گوش میانی (OME) کودکان جدا شد و با آنالیز srRNA16 به عنوان یک گونه جدید از باکتری‌ها شناسایی شد. در سال ۱۹۹۲از سوی Aguirre و Collins الویوکوکوس اوتیتیدیس (Alloiococus Otitidis)) نام‌گذاری شد و در سال ۱۹۹۳از سوی Von Graevenitz بر اساس کد باکتری‌شناسی به الویوکوکوس اوتیتیدیس (Alloiococus otitidis) تغییر نام پیدا کرد و تایید شد (۱۰). مورفولوژی این باکتری به شکل کوکسی‌های گرم مثبت درشت (دیپلوکوک یا تتراد) که از نظر ظاهر میکروسکوپی بسیار شبیه به ائروکوک‌ها و استرپتوکوک‌هاست، اما به هر حال به دلیل کاتالاز مثبت بودن از آئروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها متفاوت هستند.(۱۱) الویوکوکوس‌اوتیتیدیس باکتری گرم مثبت، کاتالاز مثبت ضعیف ، اکسیداز منفی و هوازی است.(۱۲) شناسایی این باکتری به دلیل سخت رشد و کند رشد بودن با روش‌های کشت معمول بسیار دشوار است اما PCR روش مناسبی برای شناسایی الویوکوکس است به طوری که در۲۰تا۴۰درصد از مطالعه‌ها در ترشحات گوش میانی به روش PCR شناسایی شده است.(۱۱)(۱۳) مطالعه‌های محدودی روی نقش پاتولوژیکی- ایمونولوژیکی الویوکوکوس انجام شده است.(۱۴) اگر چه الویوکوکوس اوتیتیدیس در نمونه‌های عفونت گوش میانی شناسایی شده، اما تا کنون این نکته که آیا آلویوکوکوس اوتیتیدیس به تنهایی دارای پتانسیل بیماری‌زایی در ایجاد عفونت گوش میانی است، به طور کامل اثبات نشده است. نکته قابل تامل این است که در برخی مطالعات الویوکوکوس اوتیتیدیس از کانال گوش خارجی افراد سالم جداسازی شده و این می‌تواند حضور این باکتری به عنوان فلور نرمال گوش خارجی را تایید کند.(۱۳) اگرچه در مطالعه‌های بسیاری الویوکوکوس را با شیوع بالا از نمونه‌های عفونت گوش میانی جدا سازی کرده و آن را به عنوان یکی از پاتوژن‌های اصلی گوش میانی گزارش کرده‌اند.(۱۳-۱۵) بررسی‌های انجام شده روی پاسخ‌های ایمونولوژیکی نیز نشان داده‌اند که الویوکوکوس همانند سایر پاتوژن‌های مسبب عفونت گوش میانی، توانایی فعال کردن لنفوسیت‌ها و سایتوکاین‌های التهابی و پیش التهابی مانند TNF-α و اینترلوکین ۱ را داشته و ازاین رو این ارگانیسم را به عنوان یکی از پاتوژن‌های اصلی عفونت گوش میانی در نظر می‌گیرند.(۱۴) از آنجا که مطالعات بسیار محدودی در زمینه بررسی فراوانی الویوکوکوس اوتیتیدیس در افراد مبتلا به اوتیت میانی در ایران انجام شده، هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی الویوکوکوس اوتیتیدیس به روش کشت و PCR در افراد مبتلا به عفونت گوش میانی از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امیر اعلم در سال ۹۳- ۱۳۹۲است.

مواد و روش‌ها:

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی است. جامعه مورد نظر در این مطالعه افراد مبتلا به اوتیت میانی در رده‌های مختلف سنی از هر دو جنس از زن و مرد است. این مطالعه روی۶۰ بیمار مبتلا به عفونت گوش میانی صورت گرفت، تشخیص عفونت گوش میانی و التهاب گوش میانی همراه با توجه به علائم بالینی و مشخصات OME با ترشحات از سوی پزشک متخصص گوش، حلق و بینی انجام شد. قبل از پروسه عمل جراحی و جمع آوری نمونه ,کانال گوش‌خارجی به وسیله povidine_iodine به مدت دو دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه با سالین نرمال استریل شست وشو داده شد. جمع‌آوری نمونه توسط دستگاهی به نام تمپانوسنتز انجام می‌شود. هنگام عمل جراحی، از سوی پزشک متخصص روی پرده صماخ برش کوچکی انجام گرفته و درصورت وجود مایع در گوش میانی، نمونه وارد محفظه پلاستیکی تمپانوسنتز می‌شود و نمونه‌ها در مدت کمتر از سه ساعت به بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی شهیدبهشتی انتقال داده شدند.

کشت و جداسازی باکتری:

ازمیان نمونه‌های اتخاذ شده بخشی ازحجم مایع گوش میانی برای کشت روی محیط کشت میکروبی تلقیح شد و بخشی دیگر برای انجام کارهای مولکولی مورد استفاده قرارگرفت. برای جداسازی الویوکوکوس نمونه‌ها را در محیط Muller-Hinton-Agar و Blood Agar (از شرکت Mast)که با ۵درصد خون گوسفند غنی شده با روش streal-culture کشت داده و انکوباسیون دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط ۵درصد دی‌اکسیدکربن به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. در موارد کشت منفی پلیت‌ها تا ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه در انکوباتو رنگهداری و روزانه بررسی می‌شوند. درصورت مشاهده رشدکلنی‌های موردنظر، کشت مجدد داده شده و مطالعات فنوتیپی انجام شد. ازکلنی‌های مشکوک آزمون‌های تشخیصی و تاییدی، از قبیل بررسی میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز و تست اکسیدازاصلاح شده انجام شد. دررنگ‌آمیزی گرم مرفولوژی باکتری‌ها الویوکوکوس اوتیتیدیس به صورت کوکسی درشت گرم مثبت به صورت تک تک، دوتایی و چندتایی مشاهده شدند.

استخراج DNA و PCR:

استخراج DNA از باکتری‌های ایزوله شده و مشکوک به الویوکوکوس با روش فنول کلروفرم انجام شد.(۲) در ادامه با تکنیک PCR ژنوم الویوکوکوس امپلی فای و با تکنیک الکتروفورز محصولات PCR مشاهده شد. اندازه محصولات PCR در این مطالعه۲۶۰جفت باز در نظر گرفته شد و این میزان احتمال حضورآلویوکوکوس اوتیتیدیس را نشان داد.

برای انجام واکنش PCR ازسویه آلویوکوکوساوتیتیدیس جدا شده از نمونه‌های بالینی مطالعه حاضر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این مطالعه از تکنیک PCR و پرایمرهای 5'-GGGGAAGAACACGGATAGGA-3' به‌عنوان پرایمرفورواردوازتوالی 5'-CTACGCATTTCACCGCTACAC-3' به عنوان پرایمر ریورز استفاده شد. سیکل دمایی واکنش PCR در این مطالعه در جدول شماره یک نشان داده شده است.

جدول شماره۱: سیکل دمایی واکنش PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial denaturation	94 °c	5min	1
Denaturation Annealing Extension	94 °c 55 °c 72 °c	1min 45s 45s	30
Final extension	72 °c	1min	1

یافته‌ها:

دراین مطالعه تعداد ۶۰ نمونه عفونت گوش میانی درمدت حدود۹ماه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از ترشحات گوش میانی بیماران که به تایید

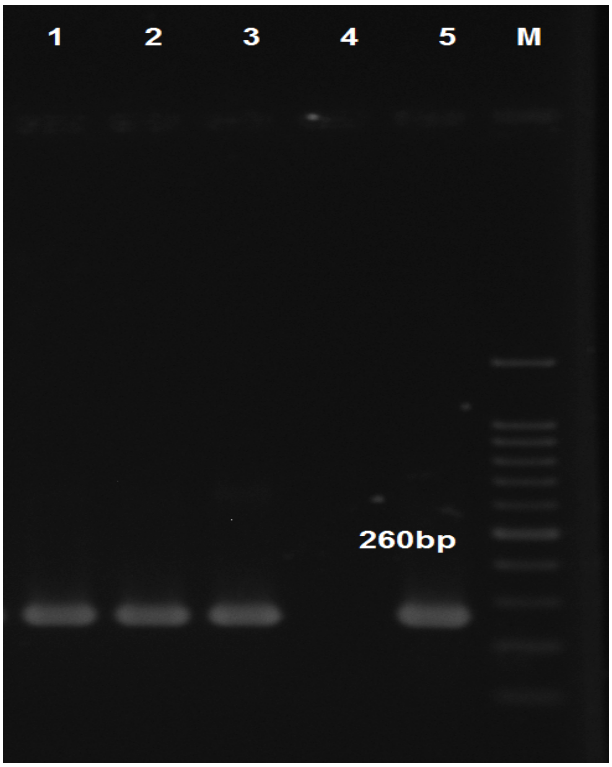
Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 3:06 +0330 on Sunday September 24th 2017

پزشک ممتخصص گوش، حلق و بینی مبتلا به اوتیت مدیا به همراه ترشحات بودند دریافت شد. از این۶۰ نمونه ۲۷نمونه (۴۵درصد) مونث و۳۳ نمونه (۵۵درصد) مذکر بودند.۲۶درصدکمتر از هفت سال ،۵۱درصد بین ۷ تا ۱۲ سال و ۲۱درصد بالای ۱۲ سال بودند.

توزیع نمونه‌ها بر حسب تشخیص الویوکوکوس اوتیتیدیس و روش‌ها در جدول شماره یک ارائه شد و نشان می‌دهد که درروش کشت سه مورد (۵) درصد (تصویر شماره۱) و در روش. CR ۲۸ نمونه (۷/۴۶) درصد شناسایی شدند و آزمون کای دو نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار است.(P<0/0001)

جدول ۲: توزیع نمونه‌های افراد مبتلا به اوتیت میانی بر حسب شناسایی الویوکوکوس اوتیتیدیس بر حسب روش‌های شناسایی

نتیجه تشخیص / روش‌ها	مثبت	منفی	جمع
کشت	3(5)	57(95)	60(100)
PCR	28(46/7)	32(53/3)	60(100)



تصویر شماره۱: نتایج الکتروفورز به دست آمده از PCR ژن 16SrRNA ایزوله‌های الویوکوکوس

M: مارکر۱۰۰ جفت بازی(۱۰۰bp)

شماره۵: چاهک مربوط به نمونه کنترل مثبت

شماره ۳ و ۲و۱: نمونه مثبت ایزوله

شماره۴: نمونه کنترل منفی

بحث:

تحقیق نشان داد که از ۶۰ نمونه عفونت گوش میانی که هر دو عفونت از AOM و OME بودند ۵ درصد به روش کشت شناسایی و جداسازی شد و با روش PCR46 درصد مثبت ارزیابی شدند. این میزان جداسازی به روش PCR در مقایسه با گزارشی که در سال ۲۰۱۲ در ایران انجام شده مشابه است(۲). اما جداسازی به روش کشت در تنها مطالعه‌ای که در ایران انجام شده ۱۵ نمونه بوده که بسیار بیشتر از میزان ایزوله‌ها در مطالعه ما به روش کشت است(۲)که این تفاوت در کشت می‌تواند ناشی از روش نمونه‌گیری متفاوت و تفاوت در نمونه بیماران و نیز تفاوت‌های فراوان مربوط به این باکتری باشد.

تکنیک PCR یک روش حساس و اختصاصی برای شناسایی باکتری‌های کند رشد، سخت رشد و نیز باکتری‌هایی است که کشت آنها در آزمایشگاه تشخیصی خطرناک است.(۲۰) برخی از مطالعه‌های تجربی و بالینی همچنین مطالعه مورد نظر نشان می‌دهد شناسایی الویوکوکوس اوتیتیدیس به روش PCR و MULTIPLEX PCR روش بسیار مناسب تری نسبت به روش‌های کشت معمول است.(۲۱،۲،۱۵)

در مطالعه‌ای در کشور آمریکا در سال ۲۰۱۰ به روش کشت، هیچ الویوکوکوسی جدا سازی نشد، اما به روش PCR32 درصد الویوکوکوس شناسایی شد.(۱۵) و در ژاپن جداسازی الویوکوکوس اوتیتیدیس به روش کشت (۲۵درصد) و به روش PCR (۷۲درصد) در نمونه‌های AOMگزارش شد و ۲۵درصد به روش کشت و ۶۹درصد به روش PCR از نمونه‌های OME شناسایی شد(۱۶). در کشور روسیه ۲۳٫۶ درصد، آمریکا ۴۰درصد، استرالیا ۴۵درصد، اسپانیا ۳۶درصد به روش PCR را به خود اختصاص دادند (۱۰۱۰, ۱۷-۱۹) و همچنین در مطالعه‌ای که در کشور ترکیه در سال ۲۰۱۲ انجام شد ۷ الویوکوک (۲۰درصد) به روش MULTIPLEX PCR شناسایی شدند.(۲۱)

درمجموع باروش کشت و PCR باکتری در۴۶ درصد از ترشحات گوش میانی شناسایی شد به طوری که تمام سه مورد ایزوله شده هم به روش PCR مثبت ارزیابی شدند و۲۵ مورد دیگر فقط درتست مولکولی نتیجه مثبت رانشان دادندکه احتمالا نشان دهنده این است که روش مولکولی حساسیت بالاتری نسبت به کشت دارد.

مطالعه‌های انجام شده و همچنین مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش PCR روش حساس‌تر و مناسب‌تری برای شناسایی این باکتری در انواع عفونت‌های گوش میانی است و روش کشت به دلیل کند رشد و سخت رشد بودن و همچنین شرایط نامساعد نمونه گیری روش مناسبی نیست. در نهایت پیشنهاد می‌شود نمونه‌گیری در سطح وسیع‌تر و در جامعه آماری بزرگ‌تری بررسی شود. همچنین بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی الویوکوکوس اوتیتیدیس برای تجویز آنتی بیوتیک مناسب در درمان عفونت گوش میانی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه با همکاری گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم‌پزشکی شهیدبهشتی انجام شده است. همچنین از گروه آموزشی گوش، حلق وبینی بیمارستان امیراعلم و مرکز هموفیلی ایران و گروه میکروب‌شناسی دانشگاه تهران قدردانی می‌شود. ضمناهزینه این پژوهش ازطرح تحقیقاتی مصوب مرکزتحقیقات عفونی گرمسیری تأمین شده است.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 3:06 +0330 on Sunday September 24th 2017

منـابع

1. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen-Julkunen A, Ylikoski J, Jero J. The clinical role of Alloiococcus otitidis in otitis media with effusion. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2002;66(1):41-8.

2. Khoramrooz SS, Mirsalehian A, Imaneini H, Jabalameli F, Sharifi A, Aligholi M, et al. Characterization of< i> Alloiococcus otitidis</i> strains isolated from children with otitis media with effusion by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2012;76(11):1658-60.

3. Pediatrics AAo. Clinical practice guideline: management of sinusitis. Pediatrics. 2001;108(3):798.

4. Worrall G. Acute otitis media. Canadian Family Physician. 2007;53(12):2147.

5. Topcuoglu N, Keskin F, Ciftci S, Paltura C, Kulekci M, Ustek D, et al. Relationship between oral anaerobic bacteria and otitis media with effusion. International journal of medical sciences. 2012;9(3):256.

6. Brook I. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy. Anaerobe. 2008;14(6):297-300.

7. Gould JM, Matz PS. Otitis media. Pediatrics in Review. 2010;31(3):102-16.

8. Bluestone CD, Klein JO. Otitis media in infants and children: PMPH-USA; 2007.

9. de Miguel Martínez I, Macías ÁR, Barreiros SB, Muñoz-Bellido JL. Microbiology of Middle Ear Effusions in 60 Children Undergoing Tympanostomy Tube Placement. 2005.

10. Ashhurst-Smith C, Hall ST, Walker P, Stuart J, Hansbro PM, Blackwell CC. Isolation of Alloiococcus otitidis from Indigenous and non-Indigenous Australian children with chronic otitis media with effusion. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2007;51(1):163-70.

11. Aguirre M, Collins M. Phylogenetic analysis of Alloiococcus otitis gen. nov., sp. nov., an organism from human middle ear fluid. International journal of systematic bacteriology. 1992;42(1):79-83.

12. Miller P, Facklam R, Miller J. Atmospheric growth requirements for Alloiococcus species and related gram-positive cocci. Journal of clinical microbiology. 1996;34(4):1027-8.

13. Tano K, Von Essen R, ERIKSSON PO, Sjöstedt A. Alloiococcus otitidis—otitis media pathogen or normal bacterial flora? Apmis. 2008;116(9):785-90.

14. Harimaya A, Himi T, Fujii N, Tarkkanen J, Carlson P, Ylikoski J, et al. Induction of CD69 expression and Th1 cytokines release from human peripheral blood lymphocytes after in vitro stimulation with Alloiococcus otitidis and three middle ear pathogens. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2005;43(3):385-92.

15. Kaur R, Adlowitz DG, Casey JR, Zeng M, Pichichero ME. Simultaneous assay for four bacterial species including Alloiococcus otitidis using multiplex-PCR in children with culture negative acute otitis media. The Pediatric infectious disease journal. 2010;29(8):741.

16. Harimaya A, Takada R, Hendolin PH, Fujii N, Ylikoski J, Himi T. High incidence of Alloiococcus otitidis in children with otitis media, despite treatment with antibiotics. Journal of clinical microbiology. 2006;44(3):946-9.

17. Perova A, Ruleva A, Belanov S, Kharit S, Sidorenko S. Clinical and bacteriological peculiarities of the acute otites media in children of 0-5 years of age: provisional data.

18. Holder RC, Kirse DJ, Evans AK, Peters TR, Poehling KA, Swords WE, et al. One third of middle ear effusions from children undergoing tympanostomy tube placement had multiple bacterial pathogens. BMC pediatrics. 2012;12(1):87.

19. Marsh RL, Binks MJ, Beissbarth J, Christensen P, Morris PS, Leach AJ, et al. Quantitative PCR of ear discharge from Indigenous Australian children with acute otitis media with perforation supports a role for Alloiococcus otitidis as a secondary pathogen. BMC Ear, Nose and Throat Disorders. 2012;12(1):11

20. Aydın E, Taştan E, Yücel M, Aydoğan F, Karakoç E, Arslan N, et al. concurrent assay for four bacterial species including Alloiococcus otitidis in middle ear, nasopharynx and tonsils of children with otitis media with effusion: a preliminary report. Clinical and experimental otorhinolaryngology. 2012;5(2):81-5.