



## Prevalência de bactérias em crianças com otite média com efusão

*Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion*

M. Beatriz Rotta Pereira<sup>1</sup>, Manuel R. Pereira<sup>2</sup>, Vlademir Cantarelli<sup>3</sup>, Sady S. Costa<sup>4</sup>

### Resumo

**Objetivos:** 1) Determinar a prevalência do *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* nas efusões de orelha média de crianças com otite média com efusão que foram submetidas à miringotomia; 2) comparar os resultados obtidos por cultura e PCR; e 3) determinar o perfil de resistência à penicilina dos germes isolados.

**Métodos:** Analisaram-se 128 amostras de efusões de orelha média de 75 crianças entre 11 meses e 10 anos de idade (média = 34,7 meses). Pacientes com otite média recorrente tinham efusão documentada por  $\geq 6$  semanas e aqueles com otite média com efusão crônica, por  $\geq 3$  meses. Os pacientes não tinham sinais de otite média aguda ou infecção do trato respiratório e não estavam sob antibioticoterapia no momento do procedimento. A aspiração do material foi realizada por timpanocentese, utilizando-se um coletor de Alden-Senturia. Os estudos bacteriológicos foram iniciados menos de 15 minutos após a obtenção da efusão, e uma parte da amostra foi armazenada a -20 °C para análise posterior pela PCR. Utilizou-se um método de PCR simultânea para a detecção de três patógenos. A análise estatística foi efetivada com o teste  $\chi^2$  de McNemar.

**Resultados:** Cultivaram-se bactérias em 32 (25,1%) das 128 amostras, e os patógenos principais foram encontrados em 25 (19,6%). A PCR identificou bactérias em 73 (57,0%) das amostras, e os resultados positivos foram: 50 (39,1%) para *H. influenzae*, 16 (12,5%) para *S. pneumoniae* e 13 (10,2%) para *M. catarrhalis*. Todas as amostras positivas por cultura foram positivas pela PCR, mas 48 (65,7%) das efusões com resultado positivo pela PCR foram negativas por cultura para os germes estudados. A PCR foi significativamente mais sensível que a cultura ( $p < 0,001$ ). Quanto ao perfil de resistência, 100% das *M. catarrhalis*, 62,5% dos *S. pneumoniae* e 23% dos *H. influenzae* eram resistentes à penicilina.

**Conclusões:** A prevalência das bactérias na otite média com efusão em um grupo de crianças brasileiras é semelhante àquelas relatadas em outros países, sendo o *H. influenzae* o mais encontrado dentre os patógenos principais da orelha média. Essa prevalência sugere que bactérias podem desempenhar um papel na patogênese da otite média com efusão. Os resultados mostram que a PCR é mais sensível na detecção de bactérias na efusão da orelha média quando comparada com cultura. A resistência à penicilina por parte do pneumococo e da moraxela é semelhante à relatada em outros países, ao passo que a produção de  $\beta$ -lactamase pelo hemófilo é mais baixa que aquela referida em bactérias isoladas em amostras de efusões de otite média com efusão.

*J Pediatr (Rio J). 2004;80(1):41-8: Otite média, otite média secreto-microbiologia, orelha média/microbiologia, PCR, estudos de prevalência, criança.*

### Abstract

**Objectives:** 1) To determine the prevalence of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in middle ear effusions of children with otitis media with effusion undergoing myringotomy; 2) to compare the results obtained by culture and PCR; and 3) to determine the susceptibility of bacterial isolates to penicillin.

**Methods:** We analyzed 128 middle ear effusion specimens from 75 children (age = 11 months to 10 years; mean = 34.7 months). Patients with recurrent otitis media had documented middle ear effusion for  $\geq 6$  weeks, and chronic otitis media with effusion for  $\geq 3$  months. The patients had no signs of acute otitis media or respiratory tract infection and were not on antibiotic therapy. Aspiration was done through tympanocentesis with an Alden-Senturia trap. Bacteriological studies were initiated less than 15 minutes after specimen collection. Part of the sample was stored at -20°C for later multiplex PCR analysis. Statistical analysis employed McNemar's  $\chi^2$  test.

**Results:** Bacteria were cultured in 32 (25.1%) out of 128 samples and the pathogens under investigation were found in 25 (19.6%). PCR was positive for bacteria in 73 (57.0%) specimens: 50 (39.1%) for *H. influenzae*, 16 (12.5%) for *S. pneumoniae*, and 13 (10.2%) for *M. catarrhalis*. All the culture-positive samples were PCR-positive, but 48 (65.7%) of the PCR-positive specimens were culture-negative. PCR was significantly more sensitive than culture ( $p < 0.01$ ) to identify bacteria. Resistance to penicillin was as follows: *M. catarrhalis* = 100%; *S. pneumoniae* = 62.5% and *H. influenzae* = 23% of the isolates.

**Conclusions:** The prevalence of bacteria in otitis media with effusion in a group of Brazilian children was similar to that reported for other countries. *H. influenzae* was the most frequent microorganism observed. This suggests that bacteria may play a role in the pathogenesis of otitis media with effusion. In addition, PCR was more sensitive to detect bacteria in middle ear effusion as compared to conventional culture methods. Penicillin resistance was similar to that reported for other countries for *pneumococci* and *moraxella*, but beta-lactamase production by *H. influenzae* was lower than that reported for other countries.

*J Pediatr (Rio J). 2004;80(1):41-8: Otitis media, otitis media with effusion/microbiology, ear, middle/microbiology, PCR, prevalence studies, child.*

1. Mestre em Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Fellow* em Otorrinolaringologia Pediátrica, Universidade de Manitoba, Winnipeg, Canadá.
2. Mestre. Professor assistente, Departamento de Pediatria das Faculdades de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
3. Doutor em Biologia Molecular e Celular, Universidade de Osaka, Japão. Responsável pelo Setor de Biologia Molecular, Laboratório Weinmann, Porto Alegre.
4. Doutor. Professor assistente, Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Artigo submetido em 12.05.03, aceito em 15.10.03.

## Introdução

Otite média com efusão (OME) é uma inflamação da orelha média em que existe uma coleção de líquido retro-timpânica, sem sinais ou sintomas de infecção aguda e com membrana timpânica íntegra. Os termos otite média secretora, otite média não-supurativa, otite média serosa e otite média mucóide são empregados como sinônimos de otite média com efusão, mas não possuem a mesma precisão. A freqüente opacificação e edema da membrana timpânica podem impedir a caracterização do tipo de efusão<sup>1</sup>.

A OME é geralmente considerada uma continuação direta do processo inflamatório que ocorre durante episódios prolongados ou recorrentes de otite média aguda (OMA), o que fica comprovado não só pelo fato de quase todos os casos de OME sucederem episódios de OMA, como também por estudos experimentais em animais<sup>2,3</sup>.

As observações acima sugerem que a OME tem uma origem infecciosa. Por outro lado, as culturas de aspirados de orelha média são positivas em apenas 20-40% dos casos de OME. As bactérias mais freqüentemente encontradas nessas culturas são o *Streptococcus pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis*<sup>4-7</sup>. Há pouco tempo, técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram adaptadas para a detecção de DNA bacteriano nas efusões de orelha média (EOM), e sua utilização elevou para perto de 80% a freqüência com que se encontrou positividade para esses microrganismos nas efusões examinadas<sup>8-10</sup>.

As prevalências acima citadas e a necessidade de definir previamente quais os microrganismos a serem identificados pela técnica da PCR determinaram a opção pela investigação do *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*.

Os conhecimentos acumulados sobre a prevalência dos microrganismos responsáveis ou envolvidos nos casos de OME podem auxiliar na seleção mais apropriada dos antimicrobianos eventualmente prescritos e podem, assim, minimizar complicações que requeiram cirurgias.

Objetivou-se determinar a prevalência das bactérias anteriormente referidas na efusão da orelha média de crianças com OME por meio das técnicas de cultura e PCR e determinar a resistência à penicilina dos germes isolados.

## Métodos

Realizou-se um estudo transversal, observacional, contemporâneo, com dados subindividuais (orelhas), e o fator em estudo foi constituído pelas efusões observadas na OME.

Partindo de uma prevalência esperada de positividade bacteriana de 65% na PCR e de 25% no exame cultural, com uma margem de erro de 10%, estimou-se um tamanho de amostra de pelo menos 72 efusões.

No período de junho de 2001 até outubro de 2002, estudaram-se 75 crianças com diagnóstico de OME provenientes de clínica de otorrinolaringologia infantil de Porto Alegre. Incluíram-se pacientes que estavam no intervalo de 9 meses a 12 anos de idade, que tinham efusão na orelha média por 6 semanas ou mais (OME), com um

diagnóstico de otite média recorrente (três ou mais episódios de OMA em 6 meses) ou de otite média com efusão crônica (persistência da efusão por 3 meses ou mais) e que apresentavam indicação de miringotomia e colocação de tubo de ventilação. Os critérios diagnósticos para OME incluíram alterações da translucidez, variação da cor, diminuição da mobilidade e aumento da vascularização radial da membrana timpânica. Todos os casos selecionados foram acompanhados pelo investigador principal por um período mínimo de 6 semanas antes da cirurgia. A imitanciometria foi realizada, quando necessária, para a confirmação da presença da efusão nos casos de otite média recorrente (OMR), e todos os pacientes com diagnóstico de otite média com efusão crônica (OMEC) foram avaliados com audiometria e imitanciometria. A otoscopia pneumática sob visão videoendoscópica foi efetuada em todos os pacientes 24 horas antes do procedimento cirúrgico. Excluíram-se pacientes que, no momento da cirurgia, apresentavam OMA, outras infecções das vias aéreas superiores, uso vigente de antibióticos ou que tivessem finalizado tratamento há menos de 7 dias.

O ato cirúrgico foi realizado com o auxílio de microscopia. A secreção analisada foi coletada da orelha média após limpeza e anti-sepsia do meato acústico externo com álcool a 70% e timpanocentese no quadrante ântero-inferior da membrana timpânica. A aspiração da efusão foi realizada com coletor de Alden-Senturia (Storz, St. Louis, EUA). O material obtido foi enviado para a realização de exame cultural e análise pela PCR no prazo máximo de 15 minutos após a coleta, tornando desnecessária a utilização de meios de transporte.

Para a cultura, o material foi semeado em placas contendo o meio de ágar sangue de carneiro e ágar chocolate (Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) e incubado, em aerobiose, durante 24 horas, a 37° C. A identificação bacteriana foi realizada por automação (Vitek®, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). A resistência à penicilina pelo *S. pneumoniae* foi determinada pela obtenção de concentrações inibitórias mínimas, empregando-se a técnica do E-teste (*E test*®, AB Biodisk, Soňa, Suécia). O teste com Nitrocefina (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foi aplicado nas colônias de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* para a determinação da capacidade de produção de  $\beta$ -lactamase<sup>11</sup>.

A PCR utilizada nesta pesquisa é um método para a detecção simultânea (*multiplex PCR*) de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*<sup>10</sup>. O gene 16S rRNA, que contém tanto seqüências variáveis quanto seqüências constantes, foi escolhido como alvo da amplificação pela PCR. As seqüências constantes são comuns a várias bactérias, e as seqüências variáveis são específicas para cada espécie.

A amostra de efusão previamente congelada passava por um processo de descongelamento, e o DNA era extraído utilizando-se o *kit* comercialmente disponível QIAamp® (Qiagen, Valencia, EUA). Para cada reação, adicionou-se 1,25 U de polimerase *Taq* (GeneAmp®, Applied Biosystems, Branchburg, EUA) em tampão apropriado, conforme instruções contidas no *kit*. Os produtos amplificados eram então separados em gel de agarose a 3% e visualizados com

luz ultravioleta. O resultado era reportado como positivo ou negativo para cada uma das bactérias<sup>10</sup>.

Os resultados do exame cultural e da PCR foram descritos por frequência absoluta e percentuais. O impacto da contribuição da PCR sobre os resultados do exame cultural foi avaliado por meio do delta percentual ( $\Delta\%$ ), definido como:

$$\Delta\% = \frac{\text{valor final} - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial}} \times 100$$

O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de McNemar foi utilizado para avaliar associações, e o nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ .

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O consentimento escrito foi obtido de todos os pais ou responsáveis após serem informados sobre o estudo. A indicação da necessidade de realização de cirurgia foi exclusivamente médica e antecedeu a admissão do paciente no estudo, sendo, inclusive, condição para inclusão na amostra.

## Resultados

Analisaram-se 128 EOM obtidas de 75 pacientes submetidos a miringotomia e colocação de tubo de ventilação. A idade variou de 11 meses a 10 anos (média  $\pm$  desvio padrão = 34,7  $\pm$  18,5 meses), 60% eram meninos e todos eram da raça branca.

Todos os pacientes incluídos na pesquisa forneceram efusão para análise. Dos 75 pacientes, 53 (70,7%) forneceram secreção de ambas as orelhas e em 29 (54,7%)

encontraram-se bactérias diferentes em cada orelha quando da análise pela PCR. Um total de 69,3% dos pacientes apresentou OMR, e 30,7% foram incluídos por apresentarem OMEC. Os pacientes com OMR tinham uma média de 5,3  $\pm$  1,4 episódios de otite por semestre, e aqueles com OMEC apresentavam um tempo médio de efusão na orelha média de 4,8  $\pm$  1,1 meses. O primeiro episódio de OMA nos pacientes incluídos na pesquisa ocorreu em média aos 12,9  $\pm$  9,2 meses.

Por meio do exame cultural, identificaram-se bactérias em 32 (25,1%) das 128 EOM, e os patógenos principais (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*) foram isolados em 25 (19,6%). Bactérias usualmente consideradas de pouca importância clínica ou não-patogênicas na orelha média foram encontradas em sete (5,5%) efusões (Tabela 1).

A PCR foi positiva para uma ou mais das bactérias estudadas em 73 (57,0%) das 128 amostras de efusões. Em 69 amostras de EOM, houve identificação de um único germe por efusão, e em seis efusões positivas encontraram-se misturas de DNA bacteriano. Juntando-se os dados de identificação isolada com os de associação de bactérias, o *H. influenzae* foi encontrado em 50 (39,1%), o *S. pneumoniae* em 16 (12,5%) e a *M. catarrhalis* em 13 (10,2%) das 128 EOM (Tabela 2).

A PCR demonstrou um desempenho superior ao exame cultural na detecção de bactérias nas amostras estudadas. A diferença entre a proporção de efusões positivas na cultura e na PCR foi estatisticamente significativa para todas as bactérias estudadas, individual e coletivamente (teste McNemar,  $p < 0,01$ ) (Tabela 3). O aumento observado na proporção de efusões com testes positivos no exame cultural, provocado pela PCR ( $\Delta\%$ ), está apresentado na Tabela 4. O acréscimo dos dados obtidos pela PCR representa um aumento de 192% do número total de efusões identificadas como positivas para um dos germes estudados.

**Tabela 1** - Exame cultural de amostras das 128 efusões de orelha média

Resultado/espécie	f	%
<i>H. influenzae</i>	12	9,4
<i>S. pneumoniae</i>	8	6,3
<i>M. catarrhalis</i>	4	3,1
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	1	0,8
Outras*	7	5,5
Negativo	96	75,0
Total	128	100,0

f: frequência.

\* *Staphylococcus epidermidis* (1), *Streptococcus oralis* (2), *Brevibacterium* sp (2) e *Corynebacterium auris* (2).

**Tabela 2** - PCR em amostras de 128 efusões de orelha média

Resultado/espécie	f	%
<i>H. influenzae</i>	44	34,4
<i>S. pneumoniae</i>	14	10,9
<i>M. catarrhalis</i>	9	7,0
<i>H. influenzae</i> + <i>S. pneumoniae</i>	2	1,6
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	4	3,1
Negativo	55	43,0
Total	128	100

f: frequência.

PCR: reação em cadeia da polimerase.

**Tabela 3** - Comparação de cultura e PCR em 128 amostras de efusões

	Total (%) de efusões Cultura (+)	Total (%) de efusões PCR (+)	p *
<i>H. influenzae</i>	13 (10,2)	50 (39,1)	< 0,01
<i>S. pneumoniae</i>	8 (6,3)	16 (12,5)	< 0,01
<i>M. catarrhalis</i>	5 (3,9)	13 (10,2)	< 0,01
Uma ou mais das espécies-alvo	25 (19,6)	73 (57,0)	< 0,01

Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

\* teste  $\chi^2$  de McNemar.

PCR: reação em cadeia da polimerase.

**Tabela 4** - Comparação dos resultados do exame cultural e da PCR por germe estudado

Bactéria	PCR	Cultura (%)		n	$\Delta\%$
		(+)	(-)		
<i>H. influenzae</i>	(+)	13 (100,0)	37 (32,2)	50	285
	(-)	-	78 (67,8)	78	
<i>S. pneumoniae</i>	(+)	8 (100,0)	8 (6,7)	16	100
	(-)	-	112 (93,3)	112	
<i>M. catarrhalis</i>	(+)	5 (100,0)	8 (6,5)	13	160
	(-)	-	115 (93,5)	115	
Total	(+)	25 (100,0)	48 (46,6)	73	192
	(-)	-	55 (53,4)	55	

Os dados são apresentados como valores absolutos, com percentuais calculados em relação ao exame cultural.

n: número de efusões.

 $\Delta\%$ : aumento percentual na positividade do exame cultural, proporcionado pelo acréscimo informativo da PCR.

PCR: reação em cadeia da polimerase.

Os germes isolados no exame cultural em 25 (19,6%) das 128 EOM foram submetidos a testes para determinar seu perfil de resistência à penicilina. Os resultados estão apresentados considerando a capacidade de produzir  $\beta$ -lactamase como sinônimo de resistência à penicilina e a outros agentes  $\beta$ -lactâmicos (Tabela 5).

### Discussão

No passado, a OME era tida como um processo estritamente inflamatório, e a efusão nela existente era considerada estéril. Contudo, em 1958, Senturia *et al.* encontraram bactérias em amostras de efusão de OME e provocaram uma mudança nos conceitos até então vigentes<sup>12</sup>.

Na análise da literatura sobre o tema, a não-uniformidade da definição de OME e do tempo de existência da EOM, além da inexistência de critérios relacionados ao uso de antibióticos por parte dos pacientes que forneceram as efusões impõem algum obstáculo para a correta valorização das informações e para a comparação com os dados gerados pela presente pesquisa. Entendemos que a dificuldade na interpretação dos dados bacteriológicos das EOM resulta, em muitas ocasiões, da quase impossibilidade de determinar em qual estágio do *continuum* da otite média se encontravam os pacientes dos quais foram obtidas as referidas secreções. Sabe-se que os trabalhos que investigam as características das efusões prolongadas da orelha média fazem-no com material aspirado por ocasião da miringotomia. Os critérios para a realização desta cirurgia são relativamente uniformes, mas poucas publicações informam com clareza o tempo em que a efusão esteve presente.

É digno de nota que o acompanhamento prolongado de uma criança por um mesmo médico ou investigador com o objetivo de caracterizar da melhor maneira possível o tipo de otite média presente e acompanhar o tempo de permanência da efusão é tarefa difícil em ambulatórios de instituições de saúde. Neste aspecto, a pesquisa por nós realizada teve a vantagem de incluir somente pacientes da clínica de otorrinolaringologia pediátrica do investigador principal,

sendo este o único responsável pelas avaliações iniciais e pelo seguimento, que incluía otoscopia pneumática sob visão endoscópica em cada consulta.

Os resultados obtidos pelo exame cultural quanto ao tipo e à frequência das bactérias presentes nas efusões provenientes de pacientes com OME são semelhantes àqueles relatados na literatura internacional (20-40%)<sup>4-7</sup>. A maior prevalência do *H. influenzae*, seguido do *S. pneumoniae* e da *M. catarrhalis*, repete, em nossa amostra, informações de outros estudos que também mostram uma inversão de ordem entre o pneumococo e o hemófilo quando esses dados são comparados com aqueles obtidos de pacientes com OMA<sup>6</sup>. Os percentuais individuais para *H. influenzae* (10,2%), *S. pneumoniae* (6,3%) e *M. catarrhalis* (3,9%) são muito semelhantes aos detectados recentemente por Sutton *et al.* ao analisarem amostras de OMR e OMEC: 12,1%, 9,6% e 5,6%, respectivamente<sup>7</sup>.

Já a comparação dos dados desta pesquisa com outros obtidos em estudos brasileiros mostra alguma discrepância. Os resultados variaram desde a negatividade em todos os exames culturais até 33,4% de positividade por este método. Entre os germes predominantes, além do *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* (nem sempre nessa ordem), também o *S. aureus*, o *S. epidermidis* e a *P. aeruginosa* colocaram-se entre os mais prevalentes<sup>13-15</sup>. É muito provável que diferenças em critérios de inclusão, metodologia microbiológica, variações geográficas e variabilidade influenciada por tamanho reduzido de amostra sejam responsáveis pelas disparidades observadas ao se compararem os dados desses trabalhos entre si e em relação ao presente estudo.

Quanto à PCR, esta aumentou significativamente a frequência de identificação bacteriana nas EOM dos diversos tipos de otite média. A positividade do PCR nessa pesquisa (57%) está de acordo com a literatura, na qual esse percentual variou entre 50 e 77,3%<sup>8-10</sup>. A frequência com que cada bactéria foi identificada apontou uma prevalência maior do *H. influenzae* (39,1%), seguido do *S. pneumoniae* (12,5%) e da *M. catarrhalis* (10,2%). Ao se

**Tabela 5** - Perfil de resistência à penicilina (\*) em 26 isolados bacterianos de amostras de efusão e otite média com efusão

Cultura (+)	Sensível		Intermediária		Resistente	
	f	(%)	f	(%)	f	(%)
<i>S. pneumoniae</i> (n=8)	3	(37,5)	3	(37,5)	2	(25)
<i>H. influenzae</i> (n=13)	10	(77)	-		3	(23)
<i>M. catarrhalis</i> (n=5)	0	(0)	-		5	(100)

Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

(\*) Avaliação do *S. pneumoniae* pelo E-teste.

Produção de  $\beta$ -lactamase pelo *H. influenzae* e *M. catarrhalis*: (-) = sensível; (+) = resistente.

f: frequência.

compararem esses dados com aqueles apresentados pelos autores já citados, verifica-se que eles se enquadram nos intervalos descritos para o *H. influenzae* (12,5-70,2%) e para o *S. pneumoniae* (6,4-35%). Por outro lado, os percentuais obtidos no presente estudo são um pouco mais baixos do que aqueles referidos para a *M. catarrhalis* (16-63%), sem, no entanto, caracterizar uma diferença significativa. Entendemos, assim como outros autores, que as pequenas diferenças observadas podem ser explicadas facilmente pela variabilidade das amostras<sup>16</sup>. Deste modo, não há indicadores de que os achados da presente pesquisa sejam efetivamente diferentes dos dados da literatura. Por último, como não se encontrou no Brasil investigação que analisasse as EOM de OME por meio da técnica da PCR, julga-se pertinente a realização de mais estudos, especialmente por se tratar de um país de dimensões continentais, composto por diferentes grupos populacionais.

Comparando os resultados do exame cultural e da PCR, percebe-se que todas as amostras com resultados positivos na cultura também foram positivas para a mesma bactéria por meio da PCR, e a diferença entre as proporções de efusões positivas na cultura (19,6%) e na PCR (57%) foi estatisticamente significativa para as bactérias incluídas na pesquisa, individual e coletivamente ( $p < 0,01$ ). Esses resultados são semelhantes e têm igual significância estatística aos relatados na literatura internacional<sup>8-10,16</sup>. O acréscimo dos dados obtidos pela PCR representou, em relação ao mesmo exame cultural, um aumento de 192% no número total de efusões identificadas como positivas para um dos germes estudados, resultado semelhante ao aumento de 268% descrito por Post *et al.* e de 260% relatado por Hendolin *et al.*<sup>9,10</sup>.

O emprego da PCR para a investigação das amostras de EOM poderia ser visto como insatisfatório, porque a detecção de genes isolados não seria necessariamente indicativa da presença de bactérias viáveis, havendo a possibilidade de representarem apenas fragmentos de DNA ou "restos fossilizados" de bactérias, como referido por Cantekin<sup>17</sup>. Trabalhos em animais esclareceram, ao nosso ver, este que é o questionamento principal acerca da aplicabilidade da PCR na investigação da origem infecciosa das doenças da orelha média. Usando o modelo de otite média em chinchilas, Post *et al.*<sup>18</sup> demonstraram que DNA bacteriano purificado e DNA de bactérias inativadas pelo calor não persistiam numa forma amplificável por mais de 3 dias após a inoculação. Além disso, bactérias sensíveis a antibióticos tornaram-se não-cultiváveis após o terceiro dia de tratamento, mas o DNA permaneceu amplificável por 3 semanas. Aul *et al.*<sup>19</sup>, auxiliados pelo mesmo modelo animal, mostraram que cepas de hemófilos resistentes à ampicilina permaneciam identificáveis, tanto pela PCR quanto por cultura, por mais de 1 mês, ao passo que o DNA de pneumococos inoculados em baixo número de colônias foi amplificado por 21 dias, apesar de não ser mais isolado culturalmente após o terceiro dia. Como na pesquisa anterior, DNA purificado de hemófilos e DNA de moraxelas inativadas pelo calor não persistiram além de 2 dias. Evidências adicionais foram oferecidas por Rayner *et al.*<sup>20</sup>, que identificaram mRNA do *H. influenzae*, uma molécula com vida média de segundos

a minutos, em EOM humanas culturalmente negativas para o mesmo germe. Mais do que isso, demonstraram que o DNA do mesmo microrganismo só era identificado nas amostras em que o mRNA também era amplificado, sugerindo que a técnica de identificação do primeiro, mais comum e mais econômica, seja suficiente para fins diagnósticos. É nosso entendimento que esses resultados sugerem que as EOM possuam mecanismos eficientes para a remoção de bactérias não-viáveis, além de um processo rápido de degradação do DNA. Por outro lado, esses achados abrem um leque de hipóteses quanto ao relacionamento complexo que possa se estabelecer na orelha média entre o micróbio e o hospedeiro, incapaz de ser detectado pelas técnicas de cultura tradicionais. Bactérias metabolicamente ativas teriam a capacidade de persistir na orelha média, e a menor frequência de identificação bacteriana pelo exame cultural, quando comparada com a PCR, seria explicada por uma ou mais das seguintes hipóteses: (a) a quantidade de microrganismos seria mais baixa que os limites de detecção cultural, usualmente apontados como  $10^4$  CFU/ml<sup>21</sup>; (b) os germes assumiriam formas L, variantes de bactérias que perderam a capacidade de sintetizar a camada peptidoglicana da sua parede e que, por isso, mudam sua forma original, tornam-se resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e impõem restrições ao seu cultivo<sup>22</sup>; (c) as bactérias estabelecer-se-iam sob a forma de biofilme, uma comunidade bacteriana em que elas aderem a uma superfície ou umas às outras, resultando em menor atividade metabólica e maior capacidade de resistência aos antimicrobianos<sup>20</sup>. As três situações poderiam ser causadas pelo tratamento com antibióticos e pela resposta imune do hospedeiro. Além disso, os microrganismos em formas L ou agrupados em biofilmes, possuidores de menor atividade metabólica e reprodutiva quando comparados às bactérias planctônicas, seriam ao menos parcialmente responsáveis pela inflamação crônica e pela persistência da efusão na orelha média de crianças, sem a indução de sintomatologia exuberante. Indubitavelmente, investigações tornam-se necessárias para a confirmação dessas hipóteses.

O número reduzido (26 isolados) certamente restringe o valor das observações relacionadas ao perfil de resistência à penicilina. No presente estudo, o *S. pneumoniae* se mostrou resistente à penicilina em 62,5% das vezes juntando-se os dados de resistência intermediária (37,5%) com os de resistência plena (25%). Os pneumococos resistentes à penicilina são muito mais comuns em crianças, e passaram a ser causa importante de fracasso terapêutico nas portadoras de otite média. O aumento nas taxas de *S. pneumoniae* penicilino-resistente tem dificultado não apenas o tratamento empírico da doença, mas também provocado uma reavaliação dos antibacterianos de escolha e renovado o interesse nas pesquisas de monitorização microbiológica. Sabe-se que as taxas de pneumococos resistentes à penicilina variam muito de uma região para outra, podendo ser de 1-5% na Suécia e 71% em Israel<sup>23-24</sup>. Por outro lado, estudos específicos de amostras de EOM oriundas de pacientes com OME demonstraram taxas entre 38 e 70%<sup>7,25,26</sup>. No Brasil, estudos de monitorização da susceptibilidade do pneumococo que não incluíram amostras de EOM encontra-

ram taxas de resistência entre 3,2 e 40%, sendo os percentuais mais baixos relatados nas pesquisas mais antigas<sup>27,28</sup>.

Os fatores de risco para infecção por pneumococos resistentes apresentados por Klein<sup>29</sup> estavam todos presentes na população desta investigação, exceto história de hospitalização. Os pacientes tinham pouca idade, freqüentavam creches e tinham uma história exuberante de exposição prévia a antibióticos, pois certamente apresentaram vários episódios de otite média tratados com esses medicamentos. Jacobs et al.<sup>30</sup> mostraram que as taxas de *S. pneumoniae* penicilino-resistente variavam muito quanto ao sítio infeccioso, desde 38% em infecções oftalmológicas até 60% nas otites médias, o que também pode explicar as taxas elevadas aqui obtidas. Já McCracken Jr.<sup>31</sup> afirmou que a maioria das cepas de pneumococo penicilino-resistente demonstra resistência intermediária, o que também aconteceu com a pequena amostra aqui estudada.

Encontraram-se 23% de *H. influenzae* resistentes à penicilina. Já na década de 80, Bluestone et al. identificaram 20-30% dos hemófilos encontrados em crianças com otite média como produtores de  $\beta$ -lactamase, e a análise específica de efusões de OME revelou 41,5 a 65% de *H. influenzae* resistentes<sup>7,25,26</sup>. No Brasil, o Programa SENTRY detectou 11,8% de hemófilos penicilino-resistentes em amostras provenientes do trato respiratório<sup>32</sup>, e uma importante contribuição de Sih<sup>33</sup> encontrou 14% de produção da enzima em germes detectados em efusões de OMA. Esses relatos sugerem que os índices de *H. influenzae* produtores de  $\beta$ -lactamase sejam um pouco mais baixos no Brasil do que em outras regiões, o que poderia explicar o número por nós encontrado. Uma vez mais, o reduzido número de isolados de *H. influenzae* (13) pode limitar o significado dessas observações.

Já a interpretação dos dados sobre a capacidade de produção de  $\beta$ -lactamase por parte da *M. catarrhalis* é mais fácil e provavelmente sofre menos a limitação imposta pelo pequeno número de vezes em que a bactéria foi isolada pelo exame cultural. Todas as moraxelas identificadas neste estudo eram resistentes à penicilina e a outros agentes  $\beta$ -lactâmicos. Estudos norte-americanos com amostras de efusões de OMA e OME apontam índices de 90-100% de produção de  $\beta$ -lactamase desde o final da década de 80<sup>6,7,25,26</sup>. No Brasil, um estudo com crianças que apresentavam OMA igualmente encontrou moraxelas produtoras de  $\beta$ -lactamase em 100% das vezes, permitindo sugerir que, em nosso meio, o comportamento do germe repete o referido na literatura internacional<sup>33</sup>.

A literatura tem registrado o aumento da incidência de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos usualmente utilizados. Vários fatores têm sido descritos como responsáveis por esta ocorrência, e o uso freqüente de antimicrobianos recebe destaque entre eles<sup>6,31</sup>. A miringotomia com aspiração e colocação de tubo de ventilação oferece uma oportunidade, ao nosso ver excelente, para a coleta de material que possibilite a monitorização da microbiologia das otites médias, o que permitiria, dessa forma, apontar tendências locais de resistência a determinados

antibióticos e eventualmente identificar uma população com maior risco de infecção por germes pouco suscetíveis.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Weinmann pela realização dos exames culturais e de PCR e ao Prof. Dr. Manuel May Pereira pela orientação microbiológica.

## Referências

1. Bluestone CD, Gates GA, Klein JO, Lim DJ, Mogi G, Ogra PL, et al. Recent advances in otitis media. 1. Definitions, terminology, and classification of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 2002;188:8-18.
2. Juhn S, Paparella M, Kim C, Goycoolea M, Giebink G. Pathogenesis of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1977;86:481-92.
3. Giebink GS. Progress in understanding the pathophysiology of otitis media. *Pediatr Rev.* 1989;11:133-8.
4. Riding KH, Bluestone CD, Michaels RH, Cantekin EI, Doyle WJ, Poziviak CS. Microbiology of recurrent and chronic otitis media with effusion. *J Pediatr.* 1978;93:739-43.
5. Giebink GS, Juhn SK, Weber ML, Le CT. The bacteriology and cytology of chronic otitis media with effusion. *Pediatr Infect Dis J.* 1982;1:98-103.
6. Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis J.* 1992;11 Suppl 8:S7-11
7. Sutton DV, Darrow DH, Derkay CS, Strasnick B. Resistant bacteria in middle ear fluid at the time of tympanostomy tube surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109:24-9.
8. Hotomi M, Tabata T, Kakiuchi H, Kunimoto M. Detection of *Haemophilus influenzae* in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. *Int J Ped Otol.* 1993;27:119-26.
9. Post JC, Preston R, Aul J, Larkins-Pettigrew M, Rydquist-White J, Anderson K, et al. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA.* 1995;273:1598-1604.
10. Hendolin P, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors J. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusion. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2854-8.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 5<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: NCCLS; 2000. [Series: NCCLS, M7-A5 = v.20, no. 2].
12. Senturia BH, Gessert CF, Carr CD, Baumann ES. Studies concerned with tubotympanitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1958;67:440-67.
13. Saffer M, Lubianca Neto JF, Piltcher OB, Petrillo VF. Chronic secretory otitis media: negative bacteriology. *Acta Otolaryngol.* 1996;116:836-9.
14. Filizzola VC, Weckx LL, Carlini D, Martino MD, Mimica IM. Estudo bacteriológico da secreção de orelha média em crianças com otite média secretora crônica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1998; 64:604-8.
15. Rezende VA, Almeida ER, Bento RF, Durigon EL, Botosso VF, Queiroz D. Estudo da flora bacteriana e viral na otite média secretora e rinofaringe na infância. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1999;65:10-7.
16. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen-Julkunen A, Ylikoski J, Jero J. The clinical role of *Alloicoccus otitidis* in otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2002;66:41-8.
17. Cantekin EI. Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA.* 1996;275:186.
18. Post JC, Aul JJ, White GJ, Wadowsky RM, Zavoral T, Tabari R, et al. PCR-based detection of bacterial DNA after antimicrobial treatment is indicative of persistent, viable bacteria in the chinchilla model of otitis media. *Am J Otolaryngol.* 1996;17: 106-11.
19. Aul JJ, Anderson KW, Wadowsky RM, Doyle WJ, Kingsley LA, Post JC, et al. Comparative evaluation of culture and PCR for the detection and determination of persistence of bacterial strains and DNAs in the Chinchilla laniger model of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998;107:508-13.

20. Rayner M, Zhang Y, Gorry M, Chen Y, Post J, Ehrlich G. Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion. *JAMA*. 1998;279:296-9.
21. Stenfors L, Räisänen S. How long do middle ear pathogens survive in mucoid effusion material. *Acta Otolaryngol*. 1989; 107:244-8.
22. Göksu N, Ataoglu H, Kemaloglu YK, Ataoglu Ö, Özsökmen D, Akyildiz N. Experimental otitis media induced by coagulase negative staphylococcus and its L-forms. *Int J Ped Otorhinolaryngol*. 1996;37:201-16.
23. Hedlund J, Svenson SB, Kalin M, Henrichsen J, Olsson-Liljequist B, Mollerberg G, et al. Incidence, capsular types, and antibiotic susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Sweden. *Clin Infect Dis*. 1995;21:948-53.
24. Dagan R, Givon-Lavi N, Shkolnik L, Yagupsky P, Fraser D. Acute otitis media caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in southern Israel: implication for immunizing with conjugate vaccines. *J Infect Dis*. 2000;181:1322-9.
25. Haddad Jr. J, Saiman L, San Gabriel P, Chin NX, Whittier S, Deeter RG, et al. Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in children with chronic otitis media with effusion and recurrent otitis media undergoing ventilating tube placement. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(5):432-7.
26. Sih T. Risk factors for recurrent otitis media and otitis media with effusion with resistant strains. In: Lim D, Bluestone C, Casselbrant M, Bakaletz L, Giebink GS, Klein J, et al., editors. *Recent advances in otitis media with effusion*. Hamilton: BC Decker; 2002. p. 217-21.
27. Chatkin JM, Fritscher CC, Rodrigues LF, Schlatter B, Villanova CA, Moraes BG. Sensibilidade do *Streptococcus pneumoniae* aos antimicrobianos: resultados preliminares. *Rev Med PUCRS*. 1989;1:81-6.
28. Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CI, de la Hoz F, Hortal M, Camou T, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva Group, 1993 to 1999. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:959-67.
29. Klein JO. Bacterial resistance and antimicrobial drug selection. In: Rosenfeld RM, Bluestone CD, editors. *Evidence-based otitis media*. Hamilton: BC Decker; 1999. p. 293-302.
30. Jacobs MR, Dagan R, Appelbaum PC, Burch D. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in middle ear fluid: multinational study of 917 children with acute otitis media. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:589-95.
31. McCracken Jr. GH. Treatment of acute otitis media in an era of increasing microbial resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17: 576-9.
32. Sader HS, Sampaio JLM, Zoccoli C, Jones RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Three Brazilian Medical Centers. *Braz J Infect Dis*. 1999;3:63-79.
33. Sih T. Acute otitis media in Brazilian children: analysis of microbiology and antimicrobial susceptibility. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:662-6.

Correspondência:  
 Maria Beatriz Rotta Pereira  
 Rua Padre Chagas, 415/902  
 CEP 90570-080 - Porto Alegre, RS  
 Tel.: (51) 3222.8909  
 Fax: (51) 3395.4666  
 E-mail: bearotta@hotmail.com