

Prevalência elevada do *Alloiococcus otitidis* na otite média com efusão através da PCR simultânea

High incidence of *Alloiococcus otitidis* in otitis media with effusion measured by multiplex PCR

M. Beatriz Rotta Pereira¹,
Vladimir Cantarell², Denise Rotta Rutkay
Pereira³, Sady Selaimen da Costa⁴

Palavras-chave: otite média, otite média secretora/microbiologia, orelha média/microbiologia, *alloiococcus otitidis*, PCR, criança.
Key words: otitis media, otitis media with effusion/microbiology, ear, middle/microbiology, *alloiococcus otitidis*, PCR, child.

Resumo / Summary

A etiologia da otite média com efusão (OME) não é completamente conhecida, mas agentes infecciosos podem contribuir para sua patogênese. O conhecimento sobre a epidemiologia bacteriana da OME em áreas geográficas distintas é essencial para a implementação de tratamentos racionais, quando indicados. **Objetivo:** Determinar a prevalência do *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Alloiococcus otitidis* nas efusões da orelha média de crianças com otite média recorrente (OMR) e otite média com efusão crônica (OMEC) que foram submetidas à miringotomia e comparar os resultados obtidos por cultura e PCR. **Forma de estudo:** Estudo clínico com coorte transversal. **Material e Método:** 128 efusões obtidas por timpanocentese de 75 crianças entre 11 meses e 10 anos de idade foram analisadas por cultura e PCR simultânea. **Resultados:** Cultivaram-se bactérias em 25,1% das amostras e os patógenos principais foram encontrados em 19,6%. O *A.otitidis* não foi isolado em cultura. A PCR identificou bactérias em 85,9%, com os seguintes resultados individuais: *A.otitidis*, 52,3%; *H.influenzae*, 39,1%; *S.pneumoniae*, 12,5% e *M.catarrhalis*, 10,2%. A PCR foi significativamente mais sensível que a cultura ($P<0,01$). O *S.pneumoniae* foi mais encontrado em OMR do que em OMEC ($P=0,038$). **Conclusões:** A prevalência das bactérias na OME 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. O *S.pneumoniae* foi mais freqüente em OMR do que em OMEC. A PCR é mais sensível na detecção de bactérias na efusão da orelha média, comparada com cultura, e é essencial para a identificação do *A.otitidis*. O elevado percentual de detecção do *A.otitidis* sugere mais investigações sobre sua atuação no início e no prolongamento de doenças da orelha média.

The etiology of otitis media with effusion (OME) is unclear but infective agents may contribute to its pathogenesis. The knowledge of the bacterial epidemiology of OME in different geographical areas is crucial for the implementation of rational treatment, when indicated. **Aim:** To determine the prevalence of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Alloiococcus otitidis* in the middle ear effusion of children with recurrent otitis media (ROM) and chronic OME undergoing myringotomy and to compare the results obtained by culture and PCR. **Study design:** Clinical study with transversal cohort. **Material and Method** A total of 128 effusions recovered by tympanocentesis from 75 children aged 11 months to 10 years were analyzed by culture and multiplex PCR. **Results:** Bacteria were cultured in 25.1% and the major pathogens were found in 19.6%. *A.otitidis* was not detected by culture. PCR yielded positive for bacteria in 85.9% of the samples and the individual results were: *A.otitidis*, 52.3%; *H.influenzae*, 39.1%; *S.pneumoniae*, 12.5%, and *M.catarrhalis*, 10.2%. PCR was significantly more sensitive than culture ($P<0.01$). *S.pneumoniae* was more frequently found in ROM when compared to chronic OME ($P=0.038$). **Conclusions:** The prevalence of bacteria in OME in a group of Brazilian children is similar to those reported from other countries, and *H.influenzae* was the most frequently found microorganism among the main middle ear pathogens. *S.pneumoniae* was more prevalent in ROM when compared to chronic OME. PCR is more sensitive in detecting bacteria in the middle ear effusion, compared to conventional culture methods, and is essential for the detection of *A.otitidis*. The high recovery rate of *A.otitidis* warrants further investigation of its role in initiating or prolonging middle ear disease.

¹ Otorrinolaringologista, Mestre em Pediatria pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Fellow em Otorrinolaringologia Pediátrica, Universidade de Manitoba, Winnipeg, Canadá.

² Doutor em Biologia Molecular e Celular pela Universidade de Osaka, Japão e Responsável pelo Setor de Biologia Molecular do Laboratório Weinmann, Porto Alegre.

³ Acadêmica de Medicina, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

⁴ Professor Assistente, Doutor, Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Autor responsável pela correspondência: M. Beatriz Rotta Pereira. Rua Padre Chagas 415, cj. 902. Porto Alegre. 90570-080.

Tel (0xx)3222-8909 Fax (0xx)3395-4666 – E-mail: bearotta@hotmail.com.

Trabalho apresentado em: III Congresso Triológico de Otorrinolaringologia (classificado entre aqueles que concorreram ao prêmio de Melhor Tema de Livro de Otolgia), 8 a 11 de outubro de 2003, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Artigo recebido em 21 de janeiro de 2004. Artigo aceito em 22 de fevereiro de 2004.

INTRODUÇÃO

A 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 caracterização do tipo de efusão pode ser dificultada pela opacificação e edema da membrana timpânica¹.

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^{2,3}.

A origem infecciosa da OME é apoiada pelo acima referido. Por outro lado, apenas 20-40% dos casos de OME apresentam culturas positivas. O *Streptococcus pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis* são os germes mais detectados^{4,7}. Recentemente, técnicas de Reação em cadeia da polimerase (PCR) foram adaptadas para detecção de DNA bacteriano nas efusões de orelha média, e sua utilização elevou para perto de 80% a frequência com que se encontrou positividade para estes microrganismos nas amostras examinadas⁸⁻¹¹.

O *Alloiococcus otitidis* foi recentemente apontado como bactéria envolvida na gênese da OME. Este germe apresenta crescimento lento e difícil nos métodos culturais convencionais, mas foi identificado em 20-50% dos aspirados de orelha média de pacientes com OME quando se utilizaram técnicas de PCR¹⁰⁻¹².

A necessidade de definir previamente quais germes a serem buscados pela PCR e as prevalências acima mencionadas determinaram a opção pela investigação do *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *A. otitidis*.

A identificação da prevalência dos microrganismos responsáveis ou envolvidos nos casos de OME pode auxiliar na escolha mais apropriada dos antimicrobianos eventualmente prescritos, minimizando assim, as complicações que requeiram cirurgias. Dessa maneira, buscou-se determinar a prevalência das bactérias anteriormente referidas, na efusão da orelha média de crianças com OME (portadoras de otite média recorrente e otite média com efusão crônica), por meio das técnicas de cultura e PCR.

MATERIAL E MÉTODO

Realizou-se um estudo transversal, observacional, contemporâneo, com dados sub-individuais (orelhas). A partir de uma prevalência esperada de positividade bacteriana na PCR de 65%, e de 25% para o exame cultural, com uma margem de erro de 10%, estimou-se um tamanho mínimo

de amostra de 72 efusões. Considerando-se que se buscava comparar as distribuições de frequência das positivities bacterianas entre otite média recorrente (OMR) e otite média com efusão crônica (OMEC), optou-se por aumentar o tamanho da amostra para 120 efusões. Isso permitiu a comparação de diferenças de pelo menos 20% entre grupos, fixando-se $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$.

Setenta e cinco crianças com diagnóstico de OME, provenientes de clínica de otorrinolaringologia infantil de Porto Alegre, foram admitidas no estudo durante o período de junho de 2001 a outubro de 2002. Incluíram-se pacientes que estivessem no intervalo de 11 meses a 10 anos de idade, que tinham efusão na orelha média por seis semanas ou mais (OME), com um diagnóstico de OMR (três ou mais episódios de OMA em seis meses) ou de OMEC (persistência da efusão por mais de três meses) e que apresentavam indicação de miringotomia e colocação de tubo de ventilação. O investigador principal acompanhou clinicamente todos os casos selecionados por um período mínimo de seis semanas antes da cirurgia. A imitanciometria foi realizada, quando necessária, para 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. Efetuou-se otoscopia pneumática sob visão vídeo-endoscópica em todos os pacientes, 24 horas antes do procedimento cirúrgico, para confirmar a ausência de sinais ou sintomas de infecção aguda. Pacientes que, no momento da cirurgia, apresentassem OMA, outras infecções das vias aéreas superiores, uso vigente de antibióticos ou história de término de tratamento há menos de sete dias foram excluídos.

Realizou-se ato cirúrgico sob anestesia geral. O material analisado foi aspirado da orelha média com um coletor de Alden Senturia (*Alden-Senturia collector*[®], Storz Instruments, St. Louis, USA), após limpeza e remoção do cerúmen do meato acústico externo (MAE), antisepsia do MAE com álcool a 70% e timpanocentese no quadrante antero-inferior da membrana timpânica. Não houve indicação do emprego de meios de transporte, pois o material obtido foi enviado para a realização de exame cultural e análise pela PCR no prazo máximo de quinze minutos após a coleta.

A PCR utilizada nesta pesquisa é um método para detecção simultânea (*multiplex* PCR) de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *A. otitidis*¹⁰. 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 era posteriormente descongelada 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. Relatou-se o resultado como positivo ou negativo para cada uma das bactérias^{10,11}.

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 S.A., Marcy-l'Etoile, França). Não havendo crescimento bacteriano neste período de tempo, as placas foram reincubadas por mais 96 horas antes de serem liberadas com resultados definitivamente negativos.

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:

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

As associações de observações emparelhadas foram avaliadas pelo teste qui-quadrado (χ^2) de McNemar e aquelas entre observações independentes pelos testes do χ^2 com correção de Yates e exato de Fisher. 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. Consentimento pós-informado escrito foi obtido de todos os pais ou responsáveis. A indicação do procedimento cirúrgico antecedeu a admissão do paciente no estudo, sendo, inclusive, condição para inclusão na amostra.

RESULTADOS

Analisaram-se 128 efusões de orelha média (EOM). Todas as 75 crianças incluídas na pesquisa forneceram material para análise. Suas idades variaram de 11 meses a 9 anos e 4 meses (média \pm desvio padrão = 34,7 \pm 18,5 meses), 60% eram meninos e todos da raça branca.

Cinquenta e três (70,7%) dos 75 pacientes forneceram secreção de ambas as orelhas e em 29 (54,7%) encontraram-se bactérias diferentes em cada orelha, quando da análise pela PCR. Diagnosticou-se OMR em 69,3% e OMEC em 30,7% dos pacientes. 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 exame cultural identificou 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%). O *A. otitidis* não foi detectado por meio da cultura e bactérias geralmente 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 110 (85,9%) das 128 EOM. Em 76 amostras houve identificação de um único germe e, em 34 efusões encontraram-se misturas de DNA bacteriano. Juntando-se estes dados, o *A. otitidis* foi encontrado em 67 (52,3%), o *H. influenzae* em 50 (39,1%), o *S. pneumoniae* em 16 (12,5%) e a *M. catarrhalis* em 13 (10,2%) das 128 EOM (Tabelas 2 e 3).

Houve um desempenho superior da PCR quando comparada ao exame cultural na detecção de bactérias nas

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>A. otitidis</i>	37	28,9
<i>H. influenzae</i>	24	18,8
<i>S. pneumoniae</i>	8	6,3
<i>M. catarrhalis</i>	7	5,5
<i>A. otitidis</i> + <i>H. influenzae</i>	20	15,7
<i>A. otitidis</i> + <i>S. pneumoniae</i>	6	4,7
<i>A. otitidis</i> + <i>M. catarrhalis</i>	2	1,6
<i>A. otitidis</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	2	1,6
<i>H. influenzae</i> + <i>S. pneumoniae</i>	2	1,6
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	2	1,6
Negativo	18	14,1
TOTAL	128	100

f: frequência

PCR: Reação em cadeia da polimerase

DISCUSSÃO

No passado, a OME era tida como um processo estritamente inflamatório, e sua efusão era considerada estéril. Contudo, em 1958, Senturia et al.¹³ encontraram bactérias em amostras de efusão de OME e provocaram uma mudança nos conceitos até então vigentes.

A falta de uniformidade na definição de OME e do tempo de existência da EOM e a inexistência de critérios relacionados ao uso de antibióticos por parte dos pacientes que forneciam as efusões impõem obstáculos para a correta valorização das informações presentes na literatura e para a comparação com os dados gerados pela presente pesquisa. Entendemos que a dificuldade na interpretação dos dados bacteriológicos das efusões da orelha média 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 e posterior implantação de tubo de ventilação. Os critérios para a realização deste procedimento cirúrgico com aspiração das efusões são relativamente uniformes, mas poucas publicações informam com clareza sobre o tempo em que a efusão

amostras estudadas. A diferença entre a proporção de efusões positivas na PCR e na cultura foi estatisticamente significativa para todas as bactérias estudadas, individual e coletivamente (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 340% do número total de efusões identificadas como positivas para um dos germes estudados, ou um aumento de 192% quando se excluem os testes de PCR positivos para o *A. otitidis*.

Das 128 efusões incluídas na pesquisa, 87 (68,0%) foram obtidas de pacientes com OMR, e 41 (32,0%) de crianças com OMEC. Na PCR, 78 (89,7%) das 87 efusões de pacientes com OMR e 32 (78,0%) das 41 efusões de pacientes com OMEC foram positivas para uma ou mais das quatro bactérias estudadas. Não houve diferença estatística entre esses índices de positividade (Tabela 5).

Procedeu-se também a análise dos resultados obtidos pela PCR em efusões de crianças de dois grupos etários diferentes, menores e maiores de dois anos de idade, e esta mostrou uma frequência semelhante de todas as bactérias nos dois grupos, excetuando-se o *H. influenzae*, encontrado em 52,4% das efusões de crianças menores de dois anos, e em 32,6% das efusões de crianças maiores ($P=0,049$) (Tabela 6).

Tabela 3. Comparação de cultura e PCR em 128 amostras de efusões

	Total (%) de efusões cultura (+)	Total (%) de efusões PCR (+)	P *
<i>A. otitidis</i>	0 (0)	67 (52,3)	-
<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)	110 (85,9)	< 0,01

Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

* teste 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>A. otitidis</i>	(+)	-	67(52,3)	67	-
	(-)	-	61(47,7)	61	
<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)	85(82,5)	110	340
	(-)	-	18(17,5)	18	

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.

esteve presente e sobre a eventual utilização concomitante de antibióticos.

O acompanhamento regular de uma criança, pelo mesmo investigador, com o objetivo de caracterizar da melhor maneira possível o tipo de OM 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.

O exame cultural forneceu resultados semelhantes àqueles relatados na literatura internacional, quanto ao tipo e à frequência das bactérias presentes nas efusões provenientes de pacientes com OME (20 – 40%)⁴⁻⁷. A maior prevalência do *H. influenzae*, seguido do *S. pneumoniae* e da *M. catarrhalis* repete, na presente 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 OMA⁶. 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.⁷ ao analisarem amostras de OMR e OMEC, que foram 12,1%, 9,6% e 5,6%, respectivamente.

Já a comparação dos dados desta pesquisa com aqueles referidos em estudos brasileiros mostra alguma discrepância. Os resultados variaram desde a negatividade em todos os exames culturais até 33,6% de positividade por este método¹⁴⁻¹⁶. Entre os germes predominantes, além do *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* (nem sempre nesta ordem), também o *S. aureus*, o *S. epidermidis* e a *P. aeruginosa* colocaram-se entre os mais prevalentes^{15,16}. 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.

Não se conseguiu isolar o *A. otitidis* por meio da cultura, confirmando suas características de crescimento lento e difícil e em consonância com estudos realizados na Europa e Japão, nos quais foi também impossível identificar este germe por exame cultural^{10-12,17,18}. É importante citar que o BHI (*brain heart infusion*), meio de cultura tido como o mais

Tabela 5. Frequência das bactérias em 128 efusões de OMR e OMEC na análise por PCR

PCR (+)	Indicação Cirúrgica		Total	P*
	OMR n = 87	OMEC n = 41		
<i>A. otitidis</i>	47 (54,0%)	20 (48,8%)	67	0,719
<i>H. influenzae</i>	32 (36,8%)	18 (43,9%)	50	0,566
<i>S. pneumoniae</i>	15 (17,2%)	1 (2,4%)	16	0,038
<i>M. catarrhalis</i>	11 (12,6%)	2 (4,9%)	13	0,302

Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

OMR: otite média recorrente; OMEC: otite média com efusão crônica

PCR: Reação em cadeia de polimerase

n: número de efusões

* χ^2 com correção de Yates

Tabela 6. Comparação dos resultados da PCR em 128 efusões de crianças menores e maiores de dois anos

PCR (+)	Idade		Total	P
	< 2 anos n = 42	≥ 2 anos N = 86		
<i>A. otitidis</i>	21 (50,0)	46 (53,5)	67	0,855 *
<i>H. influenzae</i>	22 (52,4)	28 (32,6)	50	0,049 *
<i>S. pneumoniae</i>	8 (19,0)	8 (9,3)	16	0,200 *
<i>M. catarrhalis</i>	3 (7,1)	10 (11,6)	13	0,544 **

Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

PCR: Reação em cadeia da polimerase

* χ^2 com correção de Yates

** teste exato de Fisher

n: número de efusões

Obs: a soma das efusões positivas para cada germe é maior que o número total de efusões (n), e a soma de seus percentuais é maior que 100 em virtude da ocorrência de associações bacterianas numa mesma efusão.

adequado para a detecção do *A. otitidis*, não foi utilizado no presente estudo em virtude de dificuldades técnicas, o que pode significar uma limitação. De outro lado, os meios de cultura empregados foram os mesmos que propiciaram o crescimento “acidental” que permitiu a Faden e Dryja¹⁹, em 1989, identificarem pioneiramente este microrganismo.

Quanto à PCR, esta aumentou significativamente a frequência de identificação bacteriana (85,9%) e está de acordo com a literatura, na qual esse percentual variou entre 50 e 94,5%^{8-12,18}. A frequência com que cada bactéria foi identificada apontou uma prevalência maior do *A. otitidis* (52,3%), seguido do *H. influenzae* (39,1%), *S. pneumoniae* (12,5%) e *M. catarrhalis* (10,2%). Ao se 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 – 35,0%). Por outro lado, os percentuais, obtidos no presente estudo, são pouco mais elevados do que aqueles referidos para o *A. otitidis* (20 – 50%) e pouco mais baixos do que os apontados para a *M. catarrhalis* (16,0 – 63%), sem, no entanto, caracterizar uma diferença significativa. Entendemos que as pequenas diferenças observadas podem ser explicadas facilmente pela variabilidade das amostras. 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 tratar-se de um país de dimensões continentais e diferentes grupos populacionais.

A comparação de resultados mostra que todas as amostras com resultado positivo no exame cultural 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 (85,9%) foi estatisticamente significativa para as bactérias incluídas na pesquisa, individual e coletivamente ($P < 0,01$). Estes resultados são semelhantes e com igual significância estatística aos relatados na literatura internacional^{8-10,12,18}. O acréscimo dos dados obtidos pela PCR representou, em relação ao mesmo exame cultural, um aumento de 340% no número total de efusões identificadas como positivas para um dos germes estudados, resultado semelhante ao aumento de 268% descrito por Post et al.⁹, e de 260% relatado por Hendolin et al.¹⁰.

A possibilidade da positividade na PCR representar fragmentos de DNA residual, não sendo necessariamente indicativa da presença de bactérias patogênicas viáveis, é argüida por alguns autores²⁰. 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 OM em chinchilas, Post et al.²¹ demonstraram que DNA bacteriano purificado e DNA de bactérias inativadas pelo calor não persistiam numa forma amplificável por mais de

três 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 três semanas. Aul et al.²², auxiliados pelo mesmo modelo animal, mostraram que cepas de hemófilos resistentes à ampicilina permaneciam identificáveis, tanto pela PCR quanto por cultura, por mais de um mês, ao passo que DNA de pneumococos inoculados em baixo número de colônias foram amplificados por 21 dias, apesar de não serem mais isolados culturalmente após o terceiro dia. Como na pesquisa anterior, DNA purificado de hemófilos e DNA de moraxelas inativadas pelo calor não persistiram além de dois dias. Evidências adicionais foram oferecidas por Rayner et al.²³, 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 foi amplificado, sugerindo que a técnica de identificação do primeiro, mais comum, mais simples e mais econômica seja suficiente para fins diagnósticos. É nosso entendimento que esses resultados sugerem que as EOM possuem mecanismos eficientes para a remoção de bactérias não-viáveis, além de um processo rápido de degradação do DNA. Por outro lado, esses achados levantam algumas hipóteses quanto ao relacionamento complexo que possa estabelecer-se 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/ml²⁴; (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 β -lactâmicos e impõem restrições ao seu cultivo²⁵; (c) as bactérias estabelecer-se-iam sob a forma de biofilme, uma comunidade bacteriana em que estas aderem a uma superfície ou umas às outras, resultando em menor atividade metabólica e maior capacidade de resistência aos antimicrobianos²³. Com auxílio da microscopia eletrônica, Ehrlich et al.²⁶ recentemente demonstraram a formação de biofilme na mucosa da orelha média em modelo animal de otite média, e sugeriram que este mecanismo pode ser um fator importante na patogênese da otite média com efusão crônica. As três situações acima citadas 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 responsá-

veis pela inflamação crônica e pela persistência da efusão na orelha média de crianças, sem a indução de sintomatologia exuberante^{23,25,26}. Evidentemente, a confirmação dessas hipóteses depende do prosseguimento das investigações.

O *A. otitidis* tem merecido atenção daqueles que investigam as possíveis causas bacterianas das otites médias. Sua freqüente localização intracelular e a presença associada de muitas células inflamatórias sugerem um papel patogênico para o microrganismo^{10,27,28}. Também sua identificação em efusões de maior duração e de aparência mucóide estaria associada a estágios mais crônicos de OME¹⁸. Desde a publicação pioneira de Faden e Dryja¹⁹ e a classificação do germe por Aguirre e Collins²⁹, um número expressivo de pesquisas demonstrou uma prevalência importante do *A. otitidis* na EOM de pacientes com OME, considerando-a também uma evidência para sua classificação como um patógeno da orelha média^{10,12,18}.

O emprego de técnicas de biologia molecular, como a PCR, removeu a limitação dos métodos culturais e permitiu a melhor caracterização de bactérias recentemente identificadas ou não isoladas por métodos convencionais. Uma das justificativas para o baixo índice de isolamento bacteriano em amostras de efusões de OME é a existência de germes de crescimento lento e difícil, e este é o caso do *A. otitidis*, possivelmente explicando por que não foi descrito há mais tempo^{27,28}.

Das 128 EOM estudadas, 68,0% provinham de pacientes com OMR e 32,0% com OMEC. Um dos poucos trabalhos a definir com clareza a inclusão de pacientes com as duas formas de OME foi o de Sutton et al.⁷, que apontou percentuais de 57,2% (OMR) e 42,8% (OMEC). Na análise pela PCR, o *A. otitidis* e o *H. influenzae* apresentaram distribuição semelhante nos dois grupos. O primeiro confirmou sua maior prevalência em todo o estudo e o segundo concordou com a literatura que o aponta, dentre os três principais patógenos da orelha média, como o germe mais prevalente na OME. Por outro lado, o *S. pneumoniae* foi 7,2 vezes mais freqüente na OMR do que na OMEC, o que atingiu significância estatística.

A literatura não é uniforme na apresentação de dados que possam ser cotejados com os da nossa pesquisa, mas ao passo que Hendolin et al.¹¹ não referiram uma distribuição diferente do *A. otitidis*, Jero et al.³⁰ e Leskinen et al.¹⁸ encontraram-no mais freqüentemente em efusões com mais de três meses de duração (OMEC). Brook et al.³¹ encontraram mais pneumococos (mas também hemófilos) em quem tinha menos tempo de efusão. É lícito inferir que aqueles com OMR apresentavam efusões de menor duração e tinham uma história mais recente de episódios agudos, podendo exibir um perfil bacteriológico semelhante àquele encontrado na OMA, onde o pneumococo predomina. Brook et al.³¹ já afirmaram que “*está comprovado que as EOM de crianças com OME de menor duração, quando geram exames culturais positivos, apresentam os patógenos usual-*

mente encontrados na OMA, e isto pode ter implicações para o tratamento, se acreditamos que as bactérias desempenhem um papel nesta patologia”. Entende-se que – excluindo-se as informações quanto à prevalência do *A. otitidis*, cuja importância na etiopatogênese da doença da orelha média ainda deve ser comprovada – os dados obtidos sugerem que se valorize o tempo de permanência da efusão na orelha média e o intervalo de tempo em relação ao último episódio de OMA para a tomada de decisões vinculadas à antibioticoterapia, quando esta se fizer necessária.

Apesar de não configurar objetivo do estudo, compararam-se os dados obtidos de crianças de dois grupos etários diferentes. O grupo das crianças maiores de dois anos contribuiu com o dobro das amostras das crianças menores. Não houve diferença entre as freqüências das bactérias nos dois grupos, excetuando-se o *H. influenzae*, que foi mais encontrado em crianças menores de dois anos (P=0,049). Brook et al.³¹ e Jero e Karma³², empregando métodos bacteriológicos convencionais, encontraram, de maneira estatisticamente significativa, uma maior incidência de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* nas efusões de crianças menores de dois anos com OME, o que, no presente estudo, só foi confirmado em relação ao hemófilo. Já Leskinen et al.¹⁸, utilizando a técnica da PCR, descreveram uma prevalência maior do *S. pneumoniae* no grupo das crianças menores de dois anos (P=0,04), sem confirmar este achado para as outras bactérias estudadas. Por outro lado, Riding et al.⁴ não identificaram qualquer diferença relacionada à idade. Aceitando-se como verdade a maior incidência de complicações da otite média em crianças menores de dois anos, e entendendo-se que seu pico de incidência situa-se ao final do primeiro ano de vida, permanece justificada a preocupação em identificar e caracterizar de forma eficiente e completa a doença neste grupo etário, apontando suas semelhanças e eventuais diferenças quando comparada com crianças maiores e adultos, incluindo-se aí os aspectos bacteriológicos.

Ao que se pôde constatar, o presente estudo é o primeiro realizado no Brasil em que a prevalência do *A. otitidis* foi estudada especificamente. Aqui também essa bactéria pode estar relacionada à etiopatogênese da OME, pois foi o microrganismo mais detectado nesta pesquisa e identificado em 88% das 34 amostras em que os germes estudados apareceram em associação uns com os outros, reforçando o conceito de elemento auxiliar que essa bactéria pode ter no efeito patogênico de outras bactérias, possivelmente pela capacidade de estimulação da colonização na orelha média^{10,18}. Além disso, justifica a efetivação de estudos acerca dos seus sítios de colonização e de suas características de resistências aos antimicrobianos.

CONCLUSÕES

A prevalência das bactérias na OME em um grupo de crianças brasileiras é semelhante àquelas relatadas em ou-

tros países, sendo o *H. influenzae* o mais encontrado dentre os patógenos principais da orelha média. O *S. pneumoniae* foi mais frequentemente detectado em efusões de OMR do que em efusões de OMEC, de forma estatisticamente significativa, o que não aconteceu com as outras bactérias estudadas. A maior frequência do pneumococo na OMR sugere que a bacteriologia da OME de menor duração guarde alguma semelhança com aquela encontrada na OMA.

Os resultados mostram que a PCR é mais sensível que o exame cultural na detecção de bactérias na efusão da orelha média, e é essencial para a identificação do *A. otitidis*.

O elevado percentual de detecção do *A. otitidis* sugere mais investigações sobre sua atuação no início e no prolongamento de doenças da orelha média.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. [Recent advances in otitis media: Report of the Seventh Research Conference]
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: S7-S11.
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: 1598-604.
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. Hendolin P, Paulin L, Ylikoski J. Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 125-32.
12. Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP, Pahor AL, Brown NL. Detection of *Alloicoccus* otitis in mixed bacterial populations from middle-ear effusions of patients with otitis media. *Lancet* 1999; 354: 386-9.
13. Senturia BH, Gessert CF, Carr CD, Baumann ES. Studies concerned with tubotympanitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1958; 67: 440-67.
14. Saffer M, Lubianca Neto JF, Piltcher OB, Petrillo VF. Chronic secretory otitis media: negative bacteriology. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 836-9.
15. 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.
16. 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.
17. Harimaya A, Fujii N, Mitsuzawa H, Yamazaki N, Himi T. Evaluation of specific antibody against *Alloicoccus* otitis in the middle ear fluid. In: Takasaka T, Yuasa R, Hozawa K, editors. Recent advances in otitis media: Proceedings of Otitis Media 2001, April 16-20, Sendai, Japan. Bologna: Monduzzi/International Proceedings Division; 2001. p.151-4.
18. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen-Julkunen A, Ylikoski J, Jero J. The clinical role of *Alloicoccus* otitis in otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 66: 41-8.
19. Faden H, Dryja D. Recovery of a unique bacterial organism in human middle ear fluid and its possible role in chronic otitis media. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2488-91.
20. Cantekin EI. Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA* 1996; 275: 186.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Stenfors L, Räisänen S. How long do middle ear pathogens survive in mucoid effusion material? *Acta Otolaryngol* 1989; 107: 244-8.
25. 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.
26. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear effusion in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 2002; 287: 1710-5.
27. Bosley GS, Whitney A, Pruckler J, Moss W, Daneshvar M, Sih T, et al. Characterization of ear fluid isolates of *Alloicoccus* otitis from patients with recurrent otitis media. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2876-80.
28. Sih T, Schwartz G, Bosley G, Facklam R. Chronic otitis media with effusion caused by *Alloicoccus* otitis: clinical and laboratory features. In: American Society of Microbiology. Thirty Second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington: The Society; 1992. p. 222.
29. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of *Alloicoccus* otitis gen. nov., sp. nov., an organism from human middle ear fluid. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 79-83.
30. Jero J, Leskinen K, Virolainen A, Hendolin P, Ylikoski J. The role of *Alloicoccus* otitis in the continuum of otitis media in children. Recent advances in otitis media: Seventh International Symposium: Fort Lauderdale, Fla, 1999. p. 195. [Abstracts]
31. Brook I, Yocum P, Shah K, Feldman B, Epstein S. Microbiology of serous otitis media in children: correlation with age and length of effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 87-90.
32. Jero J, Karma P. Bacteriological findings and persistence of middle ear effusion in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997; 529: 22-6.