
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE
BACTÉRIAS NA EFUSÃO DA ORELHA MÉDIA DE
CRIANÇAS SUBMETIDAS À MIRINGOTOMIA**

MARIA BEATRIZ ROTTA PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE
BACTÉRIAS NA EFUSÃO DA ORELHA MÉDIA DE
CRIANÇAS SUBMETIDAS À MIRINGOTOMIA**

MARIA BEATRIZ ROTTA PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Sady Selaimen da Costa

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2003

Dedicatória

*Ao **Manuel**, pelo amor, companheirismo e cumplicidade, compartilhados de forma tão intensa e frutífera.*

*À **Luciana** e à **Denise**, que tanto compreenderam e apoiaram minhas ausências, por colorirem e darem sentido à minha vida.*

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, Nilo e Dulce, por todo o amor e desvelo emprestados à tarefa de criar e solidificar uma família e pelo exemplo de integridade, persistência e obstinação com que sempre buscaram atingir seus objetivos.

Ao Prof. Dr. Manuel May Pereira, pela tutela acadêmica tão precocemente assumida e pelo carinho, entusiasmo e competência com que estimulou meu interesse pela microbiologia e suas relações com o mundo dos pequenos pacientes.

Ao Prof. Manuel Ruttkay Pereira, por aceitar o exercício de vários papéis, oferecendo, além do apoio incondicional de esposo, o auxílio científico indispensável ao adequado cumprimento desta tarefa.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sady Selaimen da Costa**, por sua orientação competente e incentivo constante, e por possibilitar a conjugação da otorrinolaringologia com a pediatria, na realização deste estudo.

Ao **Dr. Vlademir Cantarelli**, colaborador fundamental na parte laboratorial da pesquisa, responsável pela realização dos exames de biologia molecular.

À **Prof^ª. Dra. Tânia Sih**, sempre prestativa no envio de material de apoio ao estudo, pela amizade e estímulo profissional.

À **Prof^ª. Dra. Margaretha Casselbrant**, pela ajuda indispensável na aquisição do equipamento utilizado nesta pesquisa e pela rapidez e competência ao auxiliar-nos, desde o projeto inicial até a redação final da Dissertação.

À **Prof^ª. Dra. Elisabeth Araújo**, pela amizade e dedicação na revisão dos manuscritos.

Ao **Dr. Marcelo Gomes de Carvalho**, pelo apoio seguro durante os procedimentos de coleta do material de estudo.

Ao **Laboratório Weinmann**, na pessoa do **Dr. Rubens Hemb**, pelas imensas facilidades oferecidas para a execução desta pesquisa.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria**, na pessoa da **Prof^ª. Dra. Newra Tellechea Rotta**, pela oportunidade de crescimento acadêmico e pelo apoio e incentivo oferecidos no decorrer do curso.

Aos **pequenos pacientes e seus familiares**, motivação permanente para que busquemos incessantemente o aumento do nosso conhecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Epidemiologia da Otite Média	8
<i>2.1.1 Prevalência e Incidência</i>	8
<i>2.1.2 Fatores de Risco ou Proteção</i>	10
2.2 Etiopatogênese da Otite Média	16
<i>2.2.1 Papel dos Vírus</i>	19
<i>2.2.2 Papel das Bactérias</i>	21

2.3 Imunologia e Microbiologia da Otite Média	25
2.3.1 <i>Mecanismos de Defesa na Otite Média</i>	25
2.3.2 <i>Identificação Bacteriana</i>	28
2.3.2.1 Exame cultural	28
2.3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	38
2.3.3 <i>Resistência Bacteriana</i>	50
3 JUSTIFICATIVA	58
4 OBJETIVOS	62
4.1 Geral.....	63
4.2 Específicos.....	63
5 PACIENTES E MÉTODOS	65
5.1 Delineamento do Estudo	66
5.2 Características da Amostra Estudada	66
5.3 Critérios de Inclusão e Exclusão	67
5.3.1 <i>Critérios de Inclusão</i>	67
5.3.2 <i>Critérios de Exclusão</i>	68
5.4 Logística	68
5.4.1 <i>Inclusão dos Pacientes no Estudo</i>	68
5.4.2 <i>Coleta e Transporte do Material</i>	69
5.4.3 <i>Análise das Amostras de Efusão</i>	71

5.4.3.1 Exame cultural	71
5.4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	72
5.5 Cálculo do Tamanho da Amostra	76
5.6 Análise Estatística	76
5.7 Aspectos Éticos	77
6 RESULTADOS	78
6.1 Resultados Gerais e Caracterização dos Pacientes	79
6.2 Exame Cultural	82
6.3 Exame PCR	84
6.4 Comparação Entre os Dados do Exame Cultural e da PCR	87
6.4.1 <i>Análise para o Alloiococcus otitidis</i>	88
6.4.2 <i>Análise para o Haemophilus influenzae</i>	88
6.4.3 <i>Análise para o Streptococcus pneumoniae</i>	88
6.4.4 <i>Análise para a Moraxella catarrhalis</i>	89
6.4.5 <i>Análise Conjunta</i>	89
6.5 Frequência das Bactérias Encontradas em OMR e OMEC	91
6.6 Comparação dos Resultados Obtidos pela PCR em Efusões de Crianças Menores e Maiores de Dois Anos	93
6.7 Perfil de Resistência das Bactérias Isoladas pelo Exame Cultural	94
7 DISCUSSÃO	96
7.1 Características Gerais dos Pacientes	100

7.2 Prevalência das Bactérias nas Efusões	104
7.2.1 <i>Exame Cultural</i>	104
7.2.2 <i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>	106
7.3 Comparação Entre os Dados do Exame Cultural e da PCR	107
7.4 Presença do <i>Alloiococcus otitidis</i> nas Efusões de Orelha Média	111
7.5 Comparação da Frequência e Tipo de Germe Encontrados em Pacientes com OMR e OMEC	113
7.6 Comparação dos Achados Bacteriológicos Obtidos pela PCR em Efusões de Crianças Menores e Maiores de Dois Anos	115
7.7 Determinação da Resistência à Penicilina	117
8 CONCLUSÕES	122
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS	152

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. otitidis</i>	<i>Alloicoccus otitidis</i>
AHCPR	“Agency for Health Care and Policy Research” (Agência para Pesquisa em Cuidados e Programas de Saúde)
BHI	“Brain heart infusion” (Infuso de cérebro e coração)
CDC	“Center for Disease Control and Prevention” (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CFU	“Colony forming units” (Unidades formadoras de colônias)
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	“Deoxyribonucleic acid” (Ácido desoxiribonucleico)
EOM	Efusão de orelha média
E-teste	“Epsilometer test” (Teste para determinação da CIM em situações especiais)
EUA	Estados Unidos da América
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HEPA	“High efficiency particulate filter” (Filtro de alta eficiência para a remoção de partículas do ar)
HMW	“High molecular weight” (Elevado peso molecular)
ICAM	“Intercellular adhesion molecules” (Moléculas de adesão intercelular)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IVAI	Infecções das vias aéreas inferiores
IVAS	Infecções das vias aéreas superiores
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MAE	Meato acústico externo
MIP	“Macrophage inflammatory protein” (Proteína inflamatória dos macrófagos)
MCP	“Macrophage chemotactic protein” (Proteína quimiotática para macrófagos)

mRNA	“ <i>Messenger ribonucleic acid</i> ” (Ácido ribonucléico mensageiro)
NCCLS	“ <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> ” (Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos)
NHANES III	“ <i>Third National Health and Nutrition Examination Survey</i> ” (Terceiro Levantamento Nacional de Saúde e Nutrição)
NTHi	“ <i>Nontypeable Haemophilus influenzae</i> ” (<i>Haemophilus influenzae</i> sorologicamente não-identificável)
OM	Otite média
OMA	Otite média aguda
OMC	Otite média crônica
OME	Otite média com efusão
OMEC	Otite média com efusão crônica
OMR	Otite média recorrente
P	Proteína
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	“ <i>Polymerase chain reaction</i> ” (Reação em cadeia da polimerase)
PN	Peso ao nascer
RNA	“ <i>Ribonucleic acid</i> ” (Ácido ribonucléico)
rRNA	“ <i>Ribosomal ribonucleic acid</i> ” (Ácido ribonucléico ribossômico)
RT-PCR	“ <i>Reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i> ” (Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
16S	16 unidades Svedberg de sedimentação
TNF	“ <i>Tumor necrosis factor</i> ” (Fator de necrose tumoral)
UNIMED	Sociedade Cooperativa de Trabalho Médico Limitada
US	“ <i>United States</i> ” (Estados Unidos)
USA	“ <i>United States of America</i> ” (Estados Unidos da América)
UV	Ultravioleta
VSR	Vírus sincicial respiratório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Instrumento de aspiração e coleta de Alden-Senturia	70
Figura 2 – Visão dos produtos de amplificação pela PCR sob luz ultravioleta.....	75
Figura 3 – Tipos de efusões que forneceram amostras para o estudo	80
Figura 4 – Tipos de cirurgia realizada para a obtenção das 128 efusões.....	81
Figura 5 – Freqüência à creche dos pacientes incluídos no estudo	82
Figura 6 – Freqüência de identificação das bactérias, de forma isolada ou em associação, na análise por PCR de 128 amostras de efusões.....	84
Figura 7 – Prevalência das quatro bactérias estudadas,nas 128 amostras de efusões de orelha média, quando analisadas pela reação em cadeia da polimerase	86
Figura 8 – Representação gráfica do perfil de resistência à penicilina das bactérias estudadas	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exame cultural de amostras das 128 efusões de orelha média	83
Tabela 2 – PCR em amostras de 128 efusões de orelha média.....	85
Tabela 3 – Comparação dos resultados do exame cultural e da PCR, por germe estudado	87
Tabela 4 – Comparação de cultura e PCR em 128 amostras de efusões	90
Tabela 5 – Frequência das bactérias em 128 efusões de OMR e OMEC na análise por PCR	92
Tabela 6 – Frequência das bactérias em 128 efusões de OMR e OMEC na análise pelo exame cultural.....	92
Tabela 7 – Comparação dos resultados da PCR em 128 efusões de crianças menores e maiores de dois anos	93
Tabela 8 – Perfil de resistência à penicilina (*) em 26 isolados bacterianos de amostras de efusão de otite média com efusão	95

RESUMO

Introdução: A etiologia da otite média com efusão ainda não está completamente estabelecida, mas agentes infecciosos podem contribuir para sua patogênese. Demonstrou-se que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é superior ao exame cultural para detectar espécies bacterianas. O conhecimento sobre a epidemiologia bacteriana da otite média com efusão em áreas geográficas distintas é essencial para a implementação de tratamentos racionais, quando necessários.

Objetivos: Determinar a prevalência do *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Alloiococcus otitidis* nas efusões de orelha média de crianças com otite média recorrente e otite média com efusão crônica que foram submetidas à miringotomia, comparar os resultados obtidos por cultura e PCR, comparar os achados bacteriológicos em crianças menores e maiores de dois anos e 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 9 anos e 4 meses de idade (média = 34,7 meses). Pacientes com otite média recorrente tinham efusão documentada por ≥ 6 semanas e aqueles com otite média com efusão crônica, por ≥ 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 em 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 quatro patógenos. A análise estatística foi efetivada com o teste χ^2 de McNemar, teste χ^2 com correção de Yates e teste exato de Fisher, quando apropriados.

Resultados: Cultivaram-se bactérias em 32 (25,1%) das 128 amostras e os patógenos principais foram encontrados em 25 (19,6%). O *A. otitidis* não foi isolado em cultura. A PCR identificou bactérias em 110 (85,9%) das amostras, e os resultados positivos foram: 67 (52,3%) para *A. otitidis*, 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 85 (77,2%) das efusões com resultado positivo pela PCR foram negativas por cultura, para os germes estudados. A PCR foi significativamente mais sensível que a cultura ($P < 0,001$). O *S. pneumoniae* foi encontrado mais frequentemente em otite média recorrente do que em otite média com efusão crônica ($P = 0,038$) e o *H. influenzae* foi encontrado mais vezes em crianças menores de dois anos ($P = 0,049$). 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, 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. O *S. pneumoniae* foi mais frequente em otite média recorrente do que em otite média com efusão crônica e o *H. influenzae* foi mais encontrado em crianças menores de dois anos. A resistência à penicilina por parte do pneumococo e da moraxela é semelhante à relatada em outros países, ao passo que a produção de β -lactamase pelo hemófilo é mais baixa que aquela referida em bactérias isoladas em amostras de efusões de otite média com efusão.

Descritores: Otite média; Otite média secretora / microbiologia; Orelha média / microbiologia; Alloiococcus otitidis; PCR; Estudos de prevalência; Criança.

SUMMARY

Background: The etiology of otitis media with effusion is still unclear but infective agents may contribute to its pathogenesis. Polymerase chain reaction (PCR) has been shown to have a superior ability in detecting bacterial species, when compared to conventional culture methods. The knowledge of the bacteriological epidemiology of otitis media with effusion in different geographical areas is crucial for the implementation of rational treatment in selected cases.

Objectives: 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 and chronic otitis media with effusion undergoing myringotomy, to compare the results obtained by culture and PCR, to compare the bacteriological findings in children younger and older than two years of age, and to determine the susceptibility to penicillin of the bacterial isolates.

Methods: A total of 128 middle ear effusion samples from 75 children aged 11 months to 9 years and 4 months (mean = 34.7 months) were analyzed. Patients with recurrent otitis media had documented middle ear effusion for ≥ 6 weeks, and chronic otitis media with effusion for ≥ 3 months. Patients had no signs of acute otitis media or respiratory tract infection and were not on antibiotics. Aspiration was done through tympanocentesis with an Alden-Senturia trap. Bacteriological studies were initiated in less than 15 minutes after acquisition of the effusion and a part of the sample was stored frozen at -20°C for latter PCR analysis. Multiplex PCR methods for the detection of four pathogens were used. Statistical analyses were done using McNemar's χ^2 test, χ^2 test with Yates' correction, and Fisher's exact test, when appropriate.

Results: Bacteria were cultured in 32 (25.1%) of the 128 samples and the major pathogens were found in 25 (19.6%). *A. otitidis* was not detected by culture. PCR yielded positive for bacteria in 110 (85.9%) of the samples and these positive PCR results were: 67 (52.3%) for *A. otitidis*, 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 85 (77.2%) of the PCR-positive specimens were culture-negative. PCR was significantly more sensitive than culture ($P < 0.01$). *S. pneumoniae* was more frequently found in samples from recurrent otitis media when compared to chronic otitis media with effusion ($P = 0.038$) and *H. influenzae* was more prevalent in children younger than two years when compared to the older group ($P = 0.049$). The resistance to penicillin was: *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 is similar to that reported from other countries, and *H. influenzae* is the most frequently found microorganism among the main middle ear pathogens. This prevalence suggests that bacteria may play a role in the pathogenesis of otitis media with effusion. Also 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. *S. pneumoniae* was more frequently found in recurrent otitis media compared to chronic otitis media with effusion and *H. influenzae* was more prevalent in children younger than two years of age. Pneumococcal and moraxella's resistance to penicillin is similar to but hemophilus' β -lactamase production is lower than that reported from other countries when bacteria isolated from middle ear effusion samples of otitis media with effusion were analyzed.

Key words: Otitis media; Otitis media with effusion/microbiology; Ear, middle/microbiology; Alloiococcus otitidis; PCR; Prevalence studies; Child.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A otite média é definida como um processo inflamatório, infeccioso ou não, localizado focal ou generalizadamente na fenda auditiva (JUNH et al., 1977; PAPARELLA, 1980; COSTA et al., 2000b). É a segunda doença mais comum da infância, atrás apenas das infecções virais do trato respiratório superior. Além disso, é a doença que mais frequentemente leva crianças a serem examinadas por um médico, e suas complicações e seqüelas podem persistir até a idade adulta (GIEBINK, 1989a; HADDAD JR., 1994). Nos Estados Unidos da América (EUA), acontecem anualmente aproximadamente 25 milhões de visitas a consultórios relacionadas à otite média (SCHAPPERT, 1992).

A maioria (90%) das crianças apresenta um episódio de otite média até os sete anos de idade, sendo que 75% experimentam três ou mais episódios, e 33% desenvolvem episódios recorrentes (TEELE et al., 1989).

Efusão (ou líquido) na orelha média pode perdurar durante semanas a meses após um episódio de otite média aguda e, dependendo do tempo de permanência, provocar uma hipoacusia condutiva leve a moderada, flutuante ou persistente, podendo produzir

repercussões no desenvolvimento da fala, da linguagem e de habilidades cognitivas (BLUESTONE et al., 2002).

O diagnóstico de otite média é o que mais freqüentemente leva à recomendação de antibioticoterapia na clínica pediátrica. Estima-se que 20% das 120 milhões de prescrições anuais de antibióticos orais nos EUA destine-se ao tratamento desta doença. Já a miringotomia com colocação de tubo de ventilação é o procedimento cirúrgico mais comum em crianças, entre aqueles que exigem anestesia geral (STOOL e FIELD, 1989; SCHAPPERT, 1992; BLUESTONE, 1997). Apesar da utilização liberal de antibióticos, complicações da otite média com morbidade significativa ocorrem freqüentemente (JUNG e RHEE, 1991). Percebe-se que a enfermidade constitui-se num problema de saúde importante, especialmente na faixa etária pediátrica, e seus impactos médicos, sociais e econômicos são extremamente significativos (DALY, 1991; JUNG e RHEE, 1991).

A otite média é uma doença dinâmica. Sempre que diagnosticada, deverá ser considerada como um evento que faz parte de um processo contínuo de doença. De acordo com a teoria do *continuum* da otite média, postulada por PAPARELLA (1976, 1980), as diferentes formas de otites são a expressão clínica de um contínuo de alterações histopatológicas epiteliais e sub-epiteliais da orelha média. As limitações da nomenclatura são reflexos deste comportamento dinâmico da doença e de suas diferentes possibilidades de evolução. A confusão entre os termos utilizados no passado deveu-se, em grande parte, à incapacidade de distinguir conceitualmente o processo patológico, que é a otite média, e uma das manifestações desse processo, a otite média com efusão (SENTURIA et al., 1980).

Há, no momento, uma tentativa de atingir um consenso sobre a terminologia e as definições empregadas para descrever os vários estágios da otite média. Em 2002, foi

publicado um relatório da Sétima Conferência sobre Avanços Recentes da Otite Média acerca das definições, classificações e quadros clínicos desta doença (BLUESTONE et al., 2002). Essa terminologia, juntamente com a utilizada por GATES et al. (1989), BLUESTONE e KLEIN (1995a) e BLUESTONE (1999), foi por nós adotada no decorrer desta pesquisa e está descrita a seguir.

Otite média (OM) é uma inflamação da orelha média sem referência à etiologia ou patogênese.

Otite média sem efusão é um estágio da otite média marcado por uma inflamação da mucosa da orelha média e da membrana timpânica, com ausência de efusão. Pode ocorrer na fase inicial ou de resolução da otite média, ou na doença crônica.

Otite média aguda (OMA) é uma infecção aguda da orelha média, com início rápido de sinais e sintomas tais como otalgia, febre e irritabilidade.

Otite média recorrente (OMR) é definida como três episódios de OMA em seis meses ou quatro episódios em doze meses.

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.

Otite média com efusão crônica (OMECC) é aquela em que a efusão permanece por mais de três meses, sem sinais inflamatórios agudos. Na prática clínica, o

tempo de existência da efusão nem sempre é conhecido, e os médicos baseiam-se na presença da efusão sem outros sinais e sintomas inflamatórios para definir o diagnóstico.

Otite média crônica (OMC) é uma doença inflamatória da orelha média caracterizada pela presença de alterações teciduais irreversíveis: tecido de granulação, granuloma de colesterol, colesteatoma, alterações ossiculares e timpanoesclerose, que coexistem com uma membrana timpânica perfurada ou íntegra.

Efusão de orelha média (EOM) é a presença de líquido na orelha média, mas o termo não designa etiologia, patogênese, patologia ou duração. A efusão pode ser serosa (aquosa), mucóide (viscosa e espessa), purulenta ou a combinação dessas, e pode resultar de uma otite média aguda ou de uma otite média com efusão.

É relevante lembrar que a timpanocentese é a aspiração da efusão da orelha média através de agulha, para a obtenção de material a ser utilizado em investigação microbiológica e, quando indicada, deve preceder a miringotomia. Esta consiste numa incisão radial da membrana timpânica no quadrante antero-inferior, com aspiração e colocação de tubo de ventilação nos casos em que se faz necessária uma ventilação mais prolongada da orelha média e células da mastóide (BLUESTONE e KLEIN, 1996).

As bactérias associadas à OM são, primordialmente, comensais da nasofaringe. Ainda assim, ao invadirem a orelha média através da tuba auditiva, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo uma resposta imunológica ativa. Infecções virais prévias podem diminuir a eficiência dessa resposta. As diversas formas de apresentação da OM dependem, em grande parte, da variação que a reação do hospedeiro apresenta frente a diferentes infecções virais e bacterianas (STOOL et al., 1994).

A OME chegou a ser considerada uma patologia não-infecciosa, mas, atualmente, o papel das bactérias na sua etiologia é um assunto que recebe muita atenção (SENTURIA et al., 1958; LIM e DeMARIA, 1982; FADEN e DRYJA, 1989; BLUESTONE et al., 1992; POST et al., 1995; HENDOLIN et al., 1997; RAYNER et al., 1998; FRAISE et al., 2001; LESKINEN et al., 2002).

Tentativas de cultivo das efusões de orelha média (EOM) têm, ocasionalmente, fornecido informações imprecisas acerca da etiologia microbiana da OM. A utilização prospectiva de técnicas de cultura, tanto em estudos em seres humanos como em modelos experimentais de OM em animais, auxilia na compreensão mais clara dessa etiologia (GIEBINK et al., 1979; CHONMAITREE et al., 1994; SUZUKI e BAKALETZ, 1994). Além disso, o advento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu avanços significativos e mostrou de maneira clara que o grau de envolvimento bacteriano e viral nas várias apresentações de OM vinha sendo grosseiramente subestimado (VIROLAINEN et al., 1994; POST et al., 1995; UEYAMA et al., 1995; LIEDERMAN et al., 1998; PITKARANTA et al., 1998; HENDOLIN et al., 1999; GOK et al., 2001).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia e Fatores de Risco

2.1.1 Prevalência e Incidência

As três últimas décadas registraram mudanças significativas na epidemiologia da OM e nos seus fatores de risco (PELTON, 2002). Em 1975, HOWIE et al. empregaram o termo *otitis-prone* (predisposto à otite) para qualificar crianças que apresentavam seis ou mais episódios de OMA antes dos seis anos de idade, e um percentual de 11,6% dos pacientes acompanhados em seu estudo mereceu a referida classificação. TEELE et al. (1989), ao realizarem um estudo de coorte em que acompanharam crianças desde o nascimento até sete anos de idade, verificaram que 30% delas apresentaram OMA antes de seis meses de idade e 17% tiveram mais de três episódios antes de completarem um ano de vida. Já BLOCK et al. (2001) observaram que 60% das crianças tinham um primeiro

episódio de OMA até seis meses e 31% tiveram mais de três diagnósticos antes de completarem um ano. A cronologia desses estudos sugere um aumento na incidência de OM em crianças pré-escolares e uma ocorrência mais precoce do primeiro evento de OMA. Estudos populacionais sobre OMR nos EUA e sobre OMA na Finlândia relataram elevações de 39% e 68% respectivamente, na incidência destas doenças (LANPHEAR et al., 1997; JOKI-ERKKILA et al., 1998). Embora o crescimento na incidência de OM seja consistente com o aumento na frequência às creches, essa tendência devem ser interpretada com cautela. Fatores com potencial para interferir no diagnóstico da doença, tais como mudanças nos sistemas de saúde, acesso e uso destes cuidados e mais conhecimento sobre a OM e seus fatores de risco por parte dos pais e dos médicos podem ter ocorrido no mesmo período. Além disso, melhoraram os equipamentos para o exame do paciente, resultando hoje, em um número maior de casos de OM diagnosticados, em relação aos anos anteriores (DALY et al., 2002).

A ocorrência mais precoce da OMA e o aumento das recorrências em crianças pré-escolares têm implicações importantes no tratamento da patologia. Falhas clínicas e bacteriológicas são mais frequentemente observadas em crianças com menos de 18 meses de idade (CARLIN et al., 1991).

O pico de incidência da OMA ocorre na segunda metade do primeiro ano de vida (PUKANDER et al., 1984; SIPILÄ et al., 1987; TEELE et al., 1989; ÁLHO et al., 1993). Essa incidência diminui com a idade, de tal forma que, acima dos sete anos, poucas crianças ainda desenvolvem OMA (TEELE et al., 1989).

Já a incidência real da OME é de difícil determinação, pois, na maioria das vezes, esta patologia é assintomática. Além disso, pode resolver espontaneamente no

decorrer de um mês em até 65% das crianças entre dois e sete anos de idade (LOUS et al., 1981; CASSELBRANT et al., 1985). É importante lembrar que muitos estudos referem a presença de efusão na orelha média sem fazer a diferenciação entre otite média aguda e otite média com efusão (CASSELBRANT e MANDEL, 1999).

A prevalência de OME e OMC em escolares e pré-escolares foi descrita em países desenvolvidos e não-desenvolvidos. Os números variam muito, e as comparações diretas são difíceis em virtude de diferenças nos delineamentos e nas populações. Apesar disso, geralmente confirmam que a prevalência de OME diminui com a idade (DALY et al., 2002).

2.1.2 Fatores de Risco ou Proteção

Os fatores de risco ou proteção para as diversas formas de OM são similares, e seu reconhecimento pode auxiliar na determinação de intervenções que visem à redução da incidência da doença (PARADISE et al., 1969; WHITE et al., 1984). Serão considerados, aqui, os fatores idade e gênero, raça, frequência à creche, amamentação ao seio, exposição passiva ao fumo, predisposição genética e outros.

Idade e gênero

O primeiro episódio de OMA antes de seis meses de idade é um fator preditivo de recorrência da OMA (TEELE et al., 1989). Crianças que desenvolvem o primeiro episódio de efusão na orelha média antes dos dois meses de idade apresentam maior risco

de efusão persistente na orelha média durante o primeiro ano de vida (MARCHANT et al., 1984).

Assim como acontece com outras doenças infecciosas, o sexo masculino é um fator de risco independente para otite média. PUKANDER et al. (1982) e TEELE et al. (1989) mostraram que crianças do sexo masculino apresentavam maior risco de desenvolverem doença da orelha média e nenhum estudo mostrou incidência maior em meninas.

Estudos clínicos e populacionais mais recentes têm confirmado que a idade do primeiro episódio, pouca idade e gênero masculino são fatores de risco significativos para OMR, para OME, para tempo cumulativo com OME e para tratamento com tubo de ventilação (ÁLHO et al., 1996; PARADISE et al., 1997; JERO e KARMA, 1997b; SASSEN et al., 1997; APOSTOLOPOULOS et al., 1998; MAC TURK et al., 1999; ENGEL et al., 1999).

Raça

Nos EUA, algumas análises apontaram uma menor frequência de OMA, OMR e OME entre crianças negras quando comparadas com crianças brancas (MAC TURK et al., 1999). Contudo, CASSELBRANT et al. (1995) e PARADISE et al. (1997) mostraram taxas semelhantes tanto de OMA quanto de EOM em crianças negras e brancas acompanhadas mensalmente até dois anos de idade. Além disso, dados norte-americanos do *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), que usou timpanometria com curva B de Jerger para confirmar a existência de OME, mostraram que

pré-escolares brancos e negros têm taxas semelhantes de OME, ao passo que crianças hispânicas apresentam taxas mais elevadas (HOFFMAN et al., 1999).

Crianças aborígenes australianas e esquimós da Groenlândia e do Canadá apresentam mais episódios de OM e taxas cinco a dez vezes maiores de OMC do que outras populações da mesma faixa etária (BOSWELL e NIENHUYS, 1995, 1996; HOMOE et al., 1996; KRAMER e McCULLOUGH, 1998).

Frequência à creche

A maioria dos estudos que avaliou a relação entre creche e OM relatou que a exposição a outras crianças em casa ou numa creche aumenta o risco de OMA, OMR e OME. Este risco se eleva à medida que aumenta o número de crianças no ambiente, particularmente entre aquelas com menos de dois anos de idade (ÁLHO et al., 1996; KVAERNER et al., 1996a; PARADISE et al., 1997; ENGEL et al., 1999; NAFSTAD et al., 1999; DALY et al., 1999a). POSTMA et al. (1997) mostraram um risco significativamente maior de colocação de tubo de ventilação em crianças de creche quando comparadas com grupo controle. Contrariamente, HARSTEN et al. (1989) e STENSTROM e INGVARSSON (1997b) não encontraram uma relação significativa entre frequência à creche e OMR.

Uma pesquisa norte-americana que utilizou dados do *Child Health Supplement* de 1998 relatou que o tipo de cuidado na creche e o número de crianças no ambiente estavam fortemente associados com episódios frequentes de OM, mas a importância dessa associação diminuía com a idade (HILDESHEIM et al., 1999). ZEISEL et al. (1999), estudando crianças afro-americanas que freqüentavam creche relataram que a prevalência

de OME bilateral diminuiu de 12% entre 2 a 2,5 anos para 4% entre 4,5 a 5 anos de idade. Estes achados sugeriram que o risco de OME associado com a frequência à creche diminuiu à proporção que a criança chega próxima da idade escolar.

Estudos demonstraram que a frequência à creche também aumenta o risco de infecções das vias aéreas superiores (IVAS), infecções das vias aéreas inferiores (IVAI) e OM nos primeiros dois anos de vida (SASSEN et al., 1997; ROVERS et al., 1998). Tanto a creche quanto as infecções respiratórias são fatores de risco independentes para OM de início precoce, provavelmente porque a creche facilita tanto a colonização da nasofaringe quanto a infecção (DALY et al., 1999a).

Amamentação ao seio

Inúmeros estudos sugerem o efeito benéfico do aleitamento materno na diminuição da incidência de OMA, OMR e OME nos primeiros meses de vida (PARADISE et al., 1997; DUFFY et al., 1997; APOSTOLOPOULOS et al., 1998; KLEIN et al., 1998).

DUNCAN et al. (1993) e ANIANSSON et al. (1994) mostraram que o momento do primeiro episódio de OMA foi retardado e o número de episódios de OMA foi menor nas crianças amamentadas ao seio. UHARI et al. (1996) publicaram uma meta-análise de fatores de risco para otite média mostrando que o aleitamento materno até os três meses de idade reduzia o risco de OMA. DUFFY et al. (1997) e FADEN et al. (1997) evidenciaram que a taxa de colonização da nasofaringe com seis meses de idade era significativamente mais baixa em crianças alimentadas exclusivamente ao seio do que naquelas alimentadas exclusivamente com mamadeira, e que a colonização antes de três meses de idade estava relacionada com OM de início precoce. Por outro lado, pesquisas de

ÁLHO et al. (1995), STENSTROM e INGVARSSON (1997a), SASSEN et al. (1997), KVAERNER et al. (1997a), ROVERS et al. (1998), MAC TURK et al. (1999) e YANG et al. (1999) não concordam com o efeito benéfico do aleitamento.

Exposição passiva ao fumo

Estudos com vários delineamentos apontam uma relação diretamente proporcional entre a exposição ao fumo e OM (COLLET et al., 1995; PARADISE et al., 1997; APOSTOLOPOULOS et al., 1998). Por outro lado, existe também um número grande de estudos com resultados que não apóiam esta relação (ÁLHO et al., 1995; STENSTROM e INGVARSSON, 1997b; SASSEN et al., 1997; KVAERNER et al., 1997a; ROVERS et al., 1998; MAC TURK et al., 1999 e YANG et al., 1999).

Alguns destes estudos podem não ter poder estatístico suficiente para demonstrar relações significativas e, em outros, a inter-relação entre fumo-amamentação ao seio e fumo-classe social pode confundir as análises. Além disso, a exposição ao fumo, geralmente avaliada pelo relato materno, pode não medir adequadamente a real exposição da criança ao mesmo.

Predisposição genética

Diferenças raciais e familiares sugerem uma predisposição genética à OM (STENSTROM e INGVARSSON, 1997a; HOFFMAN et al., 1999; DALY et al., 1999a; HOMOE et al., 1999). Estudos em gêmeos na Noruega e em Pittsburgh (EUA) forneceram evidências de que a OM tem um componente hereditário importante (KVAERNER et al., 1997b; CASSELBRANT et al., 1999). O estudo norueguês

demonstrou que fatores genéticos contribuem fortemente para OM, pois a hereditariedade foi significativa para 74% das meninas e 45% dos meninos que tiveram episódios de OM. A pesquisa norte-americana confirmou a variabilidade genética da OM e relatou uma hereditariedade de 72%, sem diferença entre sexos.

Os efeitos da idade em que ocorre o primeiro episódio de OM e da predisposição à doença em indivíduos do sexo masculino podem estar relacionados a variações anatômicas ou fisiológicas determinadas geneticamente (HOMOE et al., 1996; KVAERNER et al., 1997a; PARADISE et al., 1997; MAC TURK et al., 1999; HOMOE et al., 1999). Evidências de que algumas crianças sejam particularmente suscetíveis a infecções do trato respiratório superior também sugerem um defeito na imunocompetência geneticamente determinado (KVAERNER et al., 1996b).

Outros fatores de risco ou de proteção

Fenda palatina, outras anomalias crânio-faciais e a síndrome de Down estão fortemente associadas ao aumento da prevalência de OM (PARADISE et al., 1969; WHITE et al., 1984).

Evidências recentes sugerem que prematuridade, baixo peso ao nascer (PN<1500g) e crescimento intra-uterino retardado aumentam o risco de OM (ENGEL et al., 1999).

A incidência de OM aumenta nas estações frias e diminui nos meses quentes, guardando paralelismo com a incidência de infecções das vias aéreas superiores (CASSELBRANT et al., 1985; CASTAGNO e LAVINSKY, 2001).

Alguns estudos mostraram que o uso de chupetas é um fator de risco para OM (NIEMELÄ et al., 1995; UHARI et al., 1999b). Contrariamente, BROOK e GOBER (1997) mostraram que as chupetas de crianças com OMA não carregavam uma quantidade significativa de microrganismos, concluindo que essas provavelmente não desempenhavam um papel importante na transmissão de patógenos.

Nível sócio-econômico mais baixo (PARADISE et al., 1997; CASTAGNO e LAVINSKY, 2001) e menor grau de instrução materna (APOSTOLOPOULOS et al., 1998) foram associados com uma maior incidência de OMA e OME.

Em estudo randomizado com crianças frequentadoras de creche, o uso de xilitol, sob a forma de goma de mascar ou xarope, diminuiu o risco de OMA, mas não auxiliou na resolução da efusão da orelha média (UHARI et al., 1998, 1999a).

2.2 Etiopatogênese da Otite Média

A etiopatogênese da otite média é multifatorial, e numerosos estudos propiciam um entendimento mais acurado e completo da história natural da doença. Disfunção anatômica e funcional da tuba auditiva e infecções virais ou bacterianas do trato respiratório superior são os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da patologia. Conforme citado na seção anterior, diversos fatores ligados ao hospedeiro e fatores ambientais estão relacionados a uma maior incidência de OMA e OME. (GIEBINK, 1992; BLUESTONE e KLEIN, 1995b; BLUESTONE, 1997).

A OME e a rinite alérgica são comuns em crianças pequenas e, por isso, são ocasionalmente encontradas no mesmo paciente. Estudos clínicos e experimentais não confirmaram uma relação entre alergia e OME, mas reações alérgicas do tipo I no nariz levam à obstrução tubária, sem produção de EOM. Por outro lado, estudos em animais mostraram que essa obstrução da tuba compromete significativamente a remoção de secreção preexistente na orelha média (MOGI e SUZUKI, 1997).

A disfunção da tuba auditiva parece ser o fator mais importante na patogênese da doença da orelha média em qualquer grupo etário, hipótese apresentada por Politzer em 1862, citado por BLUESTONE (1997). Conforme SADÉ (1966), estudos posteriores, contudo, sugeriram que a otite média era uma doença da membrana mucosa da orelha média e era causada por infecção ou reação alérgica neste tecido, ao invés de uma disfunção da tuba. Pesquisas mais recentes, envolvendo seres humanos e animais, mostraram que a teoria do *hydrops ex vacuo* é o mecanismo patogênico primário em muitos pacientes e, além disso, a disfunção da tuba auditiva pode promover a entrada de vírus e bactérias na orelha média, o que resulta em otite média. (BLUESTONE et al., 1972; DOYLE et al., 1994; SWARTS et al., 1995; DALY et al., 1999b).

A OME é encontrada, freqüentemente, após um episódio de OMA, que habitualmente é precedido por uma IVAS. Pode apresentar-se de forma silenciosa, sem sintomatologia aparente, e involuir espontaneamente, ou pode dar origem a episódios de OMR ou OMEC. Isso se explica porque os diferentes tipos de otite média fazem parte de um *continuum* de uma única doença (GIEBINK, 1992). A infecção das vias aéreas superiores leva à congestão da mucosa respiratória da nasofaringe e da tuba auditiva, resultando em obstrução desta última e conseqüente pressão negativa da orelha média,

decorrendo daí a aspiração de patógenos (vírus e bactérias) desde a nasofaringe até a cavidade da orelha média. A OME pode também se desenvolver através da teoria do *hydrops ex vacuo*, que propõe que a obstrução da tuba auditiva induz trocas gasosas entre a orelha média e a microcirculação da mucosa, levando a uma pressão negativa prolongada dessa orelha média e ao aparecimento de transudato (efusão serosa), por extravasamento de plasma dos vasos submucosos. A manutenção dessa pressão negativa induz alterações histopatológicas caracterizadas por uma metaplasia epitelial que resulta na produção de um exsudato (efusão mucóide), material com maior conteúdo proteico e maior viscosidade. (BLUESTONE, 1998; COSTA et al., 2000a).

A patogênese da persistência da efusão após uma infecção aguda de origem viral e/ou bacteriana da orelha média ou depois de uma transudação de efusão quando há pressão negativa elevada na cavidade da orelha média é, provavelmente, semelhante. Há estimulação de citocinas, como as IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8, de TNF- α e interferon-gama a partir de células inflamatórias da membrana mucosa da orelha média, seguida por dois caminhos inflamatórios: (a) otimização de receptores na submucosa, principalmente seletinas e integrinas, que aprisionam os linfócitos na mucosa, a qual também produz citocinas e mediadores inflamatórios e (b) estimulação dos mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, prostaglandinas, tromboxane, prostaciclina e fator de ativação plaquetária, os quais, por sua vez, promovem extravasamento de líquido da mucosa. Neste momento, há um aumento no fluxo sanguíneo da mucosa, ocasionado por engurgitamento vascular, o que resulta numa pressão negativa ainda maior, devido ao aumento da perfusão de N₂ para dentro da microcirculação da mucosa. Além disso, a efusão produzida fica aprisionada na orelha média em virtude da anatomia local, ou seja, um espaço fechado no

qual há uma passagem muito pequena, a tuba auditiva. Também o sistema mucociliar e a ação de abertura e fechamento da tuba estão comprometidos, tudo levando à persistência da efusão no local (BLUESTONE, 1998).

Como já referido anteriormente, a OME foi caracterizada por Politzer em 1862, mas somente recebeu mais atenção após o advento da antibioticoterapia, depois da Segunda Guerra Mundial. O aumento da incidência da OME, coincidindo com o aumento da utilização de antibióticos, levou alguns autores a sugerirem que o tratamento incompleto da OMA fosse uma das causas da OME (DeWEESE e SAUNDERS, 1973). Outros pesquisadores propuseram que o aumento acima citado deveu-se à melhora dos meios diagnósticos e do atendimento médico (LIU et al., 1975).

A otorrinolaringologia ainda não atingiu um consenso quanto à conduta terapêutica padrão na OME, em virtude da dificuldade em definir a etiopatogênese da afecção (SCHWARTZ, 2001).

2.2.1 Papel dos Vírus

A contribuição dos vírus respiratórios para a patogênese da doença da orelha média foi avaliada em algumas pesquisas. Os resultados indicam três papéis importantes que os vírus desempenham na otite média: (a) vírus são, algumas vezes, a única causa de otite média e representam aproximadamente 20% dos episódios de OMA; (b) a infecção viral do trato respiratório superior inicia uma cascata de eventos que predispõem à infecção bacteriana da orelha média, pois induzem a liberação de mediadores inflamatórios na

nasofaringe, aumentam a colonização e aderência de bactérias e têm efeito supressivo nos mecanismos de defesa do hospedeiro; (c) os vírus respiratórios na orelha média interferem com a resposta bacteriana à terapêutica antimicrobiana (CHONMAITREE et al., 1990; KLEIN, 1994; HEIKKINEN e CHONMAITREE, 2000;). Utilizando técnicas de isolamento e detecção antigênica, investigadores demonstraram que os vírus respiratórios estão presentes na nasofaringe de 42% dos pacientes com otite média, sendo que o vírus sincicial respiratório (VSR) e o rinovírus foram os mais encontrados, mas adenovírus, influenza e parainfluenza também são identificados freqüentemente (AROLA et al., 1990; REZENDE et al., 1999; VESA et al., 2001).

O VSR, em particular, é um causador importante de doença na orelha média. Observou-se uma clara associação entre epidemias de VSR e OM. Utilizando a técnica da PCR, pesquisadores estudaram a efusão da orelha média de pacientes em meio a um surto de infecção pelo VSR e detectaram-no em 64% das amostras (OKAMOTO et al., 1993).

O adenovírus parece associar-se com a continuidade dos sintomas na otite média, mesmo após a utilização de antibióticos. Estudos demonstraram que a associação entre infecção viral e bacteriana da orelha média é causa de OMA refratária ao tratamento, com culturas bacterianas continuamente positivas (CHONMAITREE et al., 1990). Em 1994, SUZUKI e BAKALETZ desenvolveram em chinchilas um modelo de otite média no qual demonstraram que animais co-infectados com adenovírus e *H. influenzae* apresentaram doença da orelha média mais grave do que animais que foram infectados somente com o vírus ou somente com a bactéria. Estes dados embasam a associação, amplamente reconhecida, entre co-infecção por vírus e bactéria e curso prolongado de otite média em crianças. Em outro estudo, que tinha como objetivo definir os mecanismos por

meio dos quais a infecção viral facilitava a infecção bacteriana da orelha média, demonstrou-se que a infecção de uma célula carcinomatosa pulmonar por adenovírus aumentava a aderência de cepas de *S. pneumoniae* a essas mesmas células. Os resultados sugerem que a infecção pelo vírus estimulou receptores para o pneumococo, e os autores propuseram que este possa ser um dos mecanismos pelos quais os vírus condicionam a mucosa respiratória à infecção bacteriana (HAKANSSON et al., 1994).

2.2.2 Papel das Bactérias

A colonização da nasofaringe parece ser o pré-requisito para que determinadas bactérias exerçam a capacidade de infectar a orelha média. A flora bacteriana comensal da nasofaringe engloba muitas espécies não-patogênicas, aeróbicas e anaeróbicas. Bactérias potencialmente patogênicas, tais como o *Streptococcus pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae* (a maioria deles sorologicamente não identificáveis, os NTHi), a *Moraxella catarrhalis* e, em menor escala, o *Streptococcus pyogenes*, são freqüentemente encontradas, especialmente nas faixas etárias mais baixas (BLUESTONE e KLEIN, 1995b; FORSGREN et al., 1997).

A quase totalidade das crianças é colonizada pelo *S. pneumoniae* pelo menos uma vez, nos primeiros dois anos de vida. O *H. influenzae* inicia sua colonização com poucos meses de vida e alcança 30% aos dois anos de idade. A colonização com germes potencialmente patogênicos diminui com a idade do hospedeiro e menos de 10% dos adultos são portadores de bactérias na nasofaringe (FORSGREN et al., 1997). No começo

da década passada, SHIMAMURA et al. (1990) sugeriram que diferenças na colonização da nasofaringe podem explicar por que certos indivíduos têm sua orelha média infectada e outros não. Estes pesquisadores mostraram que cepas de *S. pneumoniae* e de NTHi aderiram melhor às células epiteliais da nasofaringe de crianças do que de adultos. Além disso, a aderência foi significativamente maior em pacientes com otite média quando comparados com grupo controle. Também a presença de imunoglobulina A (IgA) secretora dirigida especificamente contra determinado patógeno associou-se com uma aderência menor deste, sugerindo que fatores adicionais do hospedeiro são também potencialmente importantes (SHIGEMI et al, 1993). Aqui cabe lembrar que o efeito protetor do leite humano contra a otite média parece ser mediado pela IgA secretora nele contida, que inibiria a colonização da nasofaringe pelo NTHi (HARABUCHI et al., 1994).

As taxas elevadas de colonização em crianças com menos de cinco anos de idade devem-se, provavelmente, à imaturidade do sistema imune. Ainda é discutido se o padrão de colonização da nasofaringe dos indivíduos que apresentam infecções frequentes difere daquele de indivíduos saudáveis. FREIJID et al. (1984) e FADEN et al. (1991) relataram que o *H. influenzae* foi encontrado de duas a sete vezes mais frequentemente em crianças predispostas à otite média do que em crianças saudáveis.

A *M. catarrhalis* coloniza a nasofaringe de até 50% das crianças e de 7,4% dos adultos (CALDER et al., 1986). A colonização da nasofaringe por esta bactéria é, portanto, um evento comum ao longo da infância e uma taxa de colonização mais elevada que o usual parece estar associada com um risco aumentado de OM (FADEN et al., 1994a).

Bactérias patogênicas prendem-se à mucosa respiratória através de componentes específicos de sua superfície. Para obter esse resultado, elas expressam

estruturas de adesão, as adesinas, que prendem o microrganismo a receptores das células epiteliais das mucosas. Estas adesinas bacterianas podem ser representadas por estruturas filamentosas (fimbrias ou pêlos) ou por sítios moleculares da parede celular (BLUESTONE e KLEIN, 1996; MAY PEREIRA, 1997).

Os pneumococos invadem o hospedeiro através da nasofaringe, onde se prendem às células epiteliais da mucosa respiratória. Embora a natureza das adesinas do *S. pneumoniae* ainda esteja sendo estudada, a parede da célula bacteriana parece ser um importante mediador da interação bactéria-hospedeiro (GEELLEN et al., 1993).

Vários estudos analisaram as moléculas que contribuem para a aderência do NTHi ao tecido epitelial do hospedeiro. BARENKAMP e St GEME (1994) mostraram que uma família de proteínas imunogênicas de elevado peso molecular (HMW) que se comportam como moléculas de aderência importantes é expressa pela maioria dos NTHi e desempenham um papel significativo na colonização por estes organismos.

A contribuição das fimbrias encontradas em todos os *H. influenzae* isolados da orelha média e das proteínas da membrana externa dessa bactéria e da *M. catarrhalis* para os processos de aderência bacteriana e colonização da nasofaringe também parece ser significativa. Cepas mutantes não-portadoras de fimbrias mostraram menor virulência em modelos de otite média em chinchilas. As proteínas da membrana externa do NTHi, denominadas P2 e P5, e algumas proteínas da membrana externa da *M. catarrhalis* ligam-se a glicoproteínas presentes nas secreções da orelha média de seres humanos (SIRAKOVA et al, 1994; REDDY et al., 1996).

A detecção de citocinas por imunohistoquímica no tecido adenoideano indicou uma correlação positiva entre IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TNF- α e taxas de

colonização da nasofaringe por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, o que sugere haver um papel para a ação dessas citocinas na manutenção de um equilíbrio imunológico na mucosa nasofaríngea, já que as amostras foram obtidas em um período livre de infecções (FORSGREN et al., 1996).

A parede celular do *S. pneumoniae* é, provavelmente, a principal responsável pelo dano inflamatório que acontece na OMA (RIPLEY-PETZOLD et al., 1988). O tratamento com penicilina ocasiona a lise da parede celular e, conseqüentemente, a liberação de fragmentos desta, especialmente peptidoglicano. Estes fragmentos estimulam a cascata inflamatória induzida por este germe na orelha média (KAWANA et al., 1992).

Componentes da parede celular do NTHi podem induzir inflamação da orelha média em chinchilas. A injeção de peptidoglicano causou alterações marcantes na mucosa local, pressão anormal e leucocitose, sugerindo que a parede celular do NTHi pode contribuir para a patogênese da otite média causada por esse microrganismo (LEAKE et al., 1994).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro podem eliminar de forma pouco eficiente as endotoxinas de microrganismos Gram-negativos, como o *H. influenzae* e a *M. catarrhalis*, presentes na orelha média. Essas endotoxinas são encontradas na efusão da orelha média de um número significativo de pacientes com OMA e OME, sabendo que, em animais, elas induzem alterações inflamatórias graves no mucoperiósteo (DeMARIA et al., 1984, 1988).

2.3 Imunologia e Microbiologia da Otite Média

2.3.1 Mecanismos de Defesa na Otite Média

A orelha média é formada pela porção timpânica da tuba auditiva, cavidade timpânica, antro e células aeradas da mastóide. A mucosa de revestimento da orelha média é uma extensão da mucosa da nasofaringe via tuba auditiva, e pode ser considerada uma mucosa do tipo respiratório modificada. Cinco tipos de células podem ser normalmente encontrados: células não-secretórias e não-ciliadas, células secretórias não-ciliadas (incluindo aí células caliciformes), células ciliadas, basais e intermediárias. Embora linfócitos, células plasmáticas, macrófagos, neutrófilos e outras células inflamatórias se acumulam na mucosa inflamada, apenas algumas células imunocompetentes são encontradas na mucosa normal da orelha média (PATEL e OGRA, 1997; COSTA e SOUZA, 2002).

Várias citocinas quimiotáticas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , MIP-1- α e MCP-1) têm sido detectadas nas efusões da orelha média durante infecções agudas causadas por bactérias e vírus, e provavelmente são sintetizadas na mesma área. (YELLON et al., 1991; OKAMOTO et al., 1993; JOHNSON et al., 1994; BIKHAZI e RYAN, 1995; PATEL et al., 1996). Recentemente, PILTCHER et al., (2002), empregando um modelo experimental de OM em ratos, avaliaram o perfil das citocinas em diferentes fases do *continuum* da doença. Concluíram que a obstrução tubária nas fases iniciais do processo, sem bactérias patogênicas, determina uma expressão e liberação de citocinas maior do que

em animais sadios, mas significativamente menor do que nos animais obstruídos e infectados. Já na fase crônica da doença, a presença anterior de bactérias patogênicas não exerceu influência sobre a expressão e a liberação daquelas citocinas, nem sobre a histologia local ou a celularidade da efusão, contrariando a hipótese sobre a importância das bactérias neste momento da doença, e reforçando a obstrução tubária como principal fator na patogênese da doença nessa fase.

As fontes iniciais das citocinas são, provavelmente, células epiteliais, fibroblastos e macrófagos. Moléculas de adesão, como a ICAM-1, a molécula de adesão celular vascular e a E-seletina, que aumentam a migração leucocitária e as interações entre leucócitos, encontram-se também aumentadas durante a fase aguda da infecção (OKAMOTO et al., 1993). Além disso, complementos e mediadores inflamatórios, como a histamina, os leucotrienos e as prostaglandinas estão aumentados na infecção da orelha média. Todas essas substâncias induzem a migração e liberação de mediadores dos neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos, basófilos e mastócitos. Essas células tomam parte na eliminação de patógenos através da fagocitose, citotoxicidade e neutralização mediada por anticorpos (JUNG e LINDA, 1988; JUNG et al., 1990; NONOMURA et al., 1991; CHONMAITREE et al., 1994).

Os anticorpos produzidos na orelha média são das classes IgA, IgG e IgM. Os anticorpos específicos contra vírus encontrados na efusão da orelha média são predominantemente da classe IgA, mas os que agem contra antígenos bacterianos pertencem às classes IgG, IgM e IgA (OGRA et al., 1974; SLOYER et al., 1975).

A frequência com que bactérias são isoladas nas efusões da orelha média é inversamente proporcional ao aumento dos níveis de IgG e IgA nestas mesmas efusões que

ocorre com o aumento da idade das crianças. Vários estudos demonstram a necessidade da cooperação existente entre a imunidade local e a sistêmica. Analisando crianças com otite média recorrente, encontrou-se que os títulos de IgG específica contra determinada cepa de *H. influenzae* são muito mais elevados do que os de IgM e IgA. Embora os níveis dos anticorpos na efusão da orelha média declinem com o passar do tempo, o mesmo não acontece com os níveis dos anticorpos séricos. De outro lado, crianças são capazes de desenvolver IgG, IgM e IgA específicos contra cepas de *M. catarrhalis* na orelha média, mas não conseguem desenvolver uma resposta sistêmica da mesma maneira (FADEN et al., 1989, 1992, 1994b).

Há evidência suficiente para afirmar que a otite média aguda pode resolver espontaneamente, sem o emprego de antibióticos. As taxas de cura espontânea variam de acordo com o patógeno específico, sendo apenas 19% no caso do *S. pneumoniae*, 48% para o *H. influenzae* e até 75% com a *M. catarrhalis*. As razões para essa resolução são desconhecidas, mas provavelmente incluem mecanismos humorais e celulares, bem como remoção através do sistema retículoendotelial (KLEIN, 1993; BARNETT e KLEIN, 1995).

2.3.2 Identificação Bacteriana

2.3.2.1 Exame cultural

Muitos estudos acerca da bacteriologia da OMA foram realizados, e os resultados demonstram claramente a importância do *Streptococcus pneumoniae*, do *Haemophilus influenzae* e da *Moraxella catarrhalis*. Estas três bactérias são responsáveis por aproximadamente 85% das infecções agudas da orelha média. Estudos em crianças com OME indicam que esses microrganismos também podem estar presentes na efusão, sugerindo que têm um papel no desenvolvimento e persistência daquela (BLUESTONE e KLEIN, 1996).

Em 1942, na era pré-antibiótica, Richardson, citado por KLEIN (2000), efetuou cultura da efusão de orelha média de 665 crianças com OMA e encontrou *Streptococcus* β -hemolítico em 25%, *S. pneumoniae* em 27%, *Staphylococcus aureus* em 11% e *M. catarrhalis* em 1% das vezes.

Os resultados de doze estudos bacteriológicos na OMA, realizados na Suécia, Finlândia e EUA nos períodos de 1952-81 e 1981-87, foram similares entre si, coincidiram na apresentação das bactérias mais prevalentes e demonstraram um aumento na incidência das infecções por elas causadas, a saber: *S. pneumoniae*, de 33 para 39%, *H. influenzae*, de 21 para 27% e *M. catarrhalis*, de 3 para 10% (BLUESTONE e KLEIN, 1996). Segundo KLEIN (2000), as razões para essas modificações não são inteiramente conhecidas, mas estão provavelmente associadas a alterações da ecologia das espécies bacterianas.

SIH (2001), estudando efusões da orelha média obtidas de 300 crianças brasileiras com OMA, identificou microrganismos em 192 (64%) desses pacientes. Os cinco germes mais prevalentes foram o *S. pneumoniae* (16%), *H. influenzae* (7%), *M. catarrhalis* (5%), *Pseudomonas aeruginosa* (2%) e *S. aureus* (1%). Resistência intermediária à penicilina foi detectada em 56,2% dos isolados de *S. pneumoniae*, sendo que 14,2 % dos *H. influenzae* e 100% das *M. catarrhalis* foram produtoras de β -lactamase.

Quanto à OME, o insucesso nas tentativas de identificação bacteriana nas efusões sugeria que estas fossem estéreis. Entretanto, após examinarem 130 EOM obtidas de 105 pacientes, predominantemente crianças, SENTURIA et al. (1958) publicaram um estudo que modificaria o conceito, então vigente, de que as otites médias com efusão fossem puramente de origem alérgica. Embora as definições atuais dos diversos tipos de otite não fossem então empregadas, a leitura do relato permite entender que efusões de OMA, OMR e OME foram incluídas no estudo, mas analisadas separadamente. As efusões relatadas como de aspecto seroso ou mucóide renderam um percentual de mais de 30% de positividade no exame cultural, aliado a um número significativo de leucócitos e à ausência de eosinófilos na avaliação microscópica. Isso levou os pesquisadores a afirmarem que os dados sugeriam um papel importante das bactérias na gênese das otites com efusão, ao mesmo tempo em que diminuía a importância de um processo alérgico na etiopatogênese da doença, apesar de não descartá-lo como fator predisponente.

LIU et al. (1975) avaliaram 102 efusões de 100 pacientes com OME, encontrando exame bacterioscópico positivo em 77% delas e uma positividade em cultura de 53%. O estudo mostrou uma prevalência bem maior de culturas positivas em crianças menores de seis anos de idade e determinou que as taxas de isolamento bacteriano eram

inversamente proporcionais ao aumento dos níveis de IgA, IgG e lisozimas na efusão que ocorria com o avançar da idade. Essa pesquisa também mostrou que a produção de imunoglobulinas é baixa até os dois anos e aumenta posteriormente, alcançando, aos oito anos de idade, níveis séricos semelhantes aos do adulto. Os autores afirmaram que a presença de bactérias em aproximadamente dois terços das efusões indicava a possibilidade do envolvimento daquelas na gênese da OME, e que o declínio da incidência dessa patologia após oito anos de idade era devido ao amadurecimento do sistema imunológico do hospedeiro. Também contestaram pesquisadores que entendiam deverem-se os achados culturais citados à contaminação da amostra de efusão com bactérias oriundas do meato acústico externo, por ocasião da coleta do material, afirmando que a flora bacteriana deste meato é diferente da população bacteriana encontrada nas efusões.

RIDING et al. (1978), estudando as efusões de orelha média de 274 crianças com OMR e OMEC, encontraram bactérias em 45% das amostras e referiram que, em 11% das vezes, tratava-se de germes provavelmente patogênicos, como o *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *S. pyogenes*.

GIEBINK et al. (1979), realizando exame cultural em amostras de 144 efusões de orelha média de crianças com otite média serosa e mucóide, encontraram 30% de positividade para bactérias aeróbias, com predomínio do *H. influenzae* nas efusões serosas e do *Staphylococcus epidermidis* nas efusões mucóides. Concluíram que seus achados sugeriam uma participação das bactérias aeróbicas na patogênese da otite média serosa e mucóide.

LEWIS et al. (1979) analisaram a efusão de 25 pacientes com OME utilizando cultura e imunofluorescência indireta. Esta também foi empregada para detectar a presença

de anticorpos específicos no soro. *H. influenzae* e *S. pneumoniae* foram os germes mais encontrados e documentou-se a presença de anticorpos específicos em todas as efusões onde a cultura foi positiva. Um total de 80% das efusões e 86% dos soros apresentaram anticorpos específicos para esses microrganismos (IgG e IgA secretora), levando os autores a concluir que as bactérias isoladas não eram contaminantes, e deveriam estar envolvidas na gênese da doença.

SUNDBERG et al. (1981) estudaram 76 crianças com OME e isolaram bactérias em 79% do material obtido da nasofaringe e em 18% das efusões de orelha média. Os germes encontrados nas secreções de orelha média também foram identificados na nasofaringe, o que levou os autores a sugerir que existe uma correlação forte entre a colonização da nasofaringe por patógenos respiratórios e a ocorrência de OME.

Novamente GIEBINK et al. (1982) avaliaram amostras de EOM de 729 crianças com OMEC e encontraram um percentual de 35% de culturas positivas, predominando *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Neisseria* sp e *S. epidermidis*. Nesta pesquisa, 17% das efusões com exame cultural negativo tinham exame bacterioscópico positivo. A identificação de bactérias diferentes nas orelhas de pacientes com otite média bilateral ocorreu em 32% destes casos.

FADEN e DRYJA (1989) realizaram 320 miringotomias em 200 crianças com OME e, com a utilização de meios de cultura com ágar sangue de carneiro e ágar chocolate, encontraram uma positividade em cultura de 23% para o *H. influenzae*, 14% para o *S. pneumoniae*, 11% para a *M. catarrhalis* e 30% para outros microrganismos. Entre estes últimos, 16 isolados obtidos de efusões de orelha média de 10 crianças foram cocos Gram-positivos, com crescimento em aerobiose, que apareceram sob forma isolada em 11

amostras e junto com outras bactérias em cinco ocasiões. Esse germe não foi encontrado no meato acústico externo das crianças estudadas e sua localização intracelular freqüente, aliada à presença de muitas células inflamatórias, levou os autores a sugerir um papel patogênico para ele. Também o fato da bactéria não ter sido identificada em efusões de crianças com OMA reforçaria a importância da mesma na gênese da doença crônica da orelha média. O germe em questão foi mais tarde identificado como *Alloiococcus otitis* por AGUIRRE e COLLINS (1992b), e teve sua nomenclatura modificada para *Alloiococcus otitidis* por VON GRAEVENITZ (1993).

STENFORS e RÄISÄNEN (1989) buscaram determinar o período de sobrevivência de determinadas bactérias, em efusões mucóides de orelha média. Para isso, utilizaram 28 amostras de efusões espessas, hidrofílicas e viscosas, obtidas de 17 pacientes com OME e não contendo bactérias. Essas amostras foram divididas em cinco grupos, nos quais se injetaram colônias de *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa obtidas de amostras de efusão de crianças com OMA. O *H. influenzae* e o *S. pneumoniae* sobreviveram apenas dois dias em amostras incubadas a 37°C, ao passo que a *M. catarrhalis* e os estafilococos permaneceram viáveis durante 18-24 dias. O estudo permitiu concluir que a efusão mucóide é um meio de cultura pobre para *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, provavelmente por conter pouca quantidade de dióxido de carbono e que sua composição também deve ter a função de impedir a ascensão de bactérias provenientes da nasofaringe.

Um estudo finlandês realizado por QVARNBERG et al. (1990) envolveu 2575 crianças com OMEC e OMR que foram submetidas a miringotomia e forneceram 4952 amostras de efusões de orelha média. Os resultados mostraram um percentual de 22,1% de

positividade em cultura para bactérias potencialmente patogênicas e identificaram o *S. pneumoniae* como a bactéria mais prevalente em crianças menores de um ano e o *H. influenzae* como a bactérias mais encontrada em crianças acima desta idade.

BLUESTONE et al. (1992) publicaram um grande estudo que utilizou dados coletados num período de 10 anos (1980-1989), por um dos grupos mais respeitados e ativos em otorrinolaringologia pediátrica, reunido sob a denominação *The Pittsburgh Otitis Media Research Center*. Este levantamento envolveu 7396 amostras de efusões de orelha média, das quais 4589 foram coletadas de crianças com OME. Bactérias foram identificadas por cultura convencional em dois terços das 4589 amostras de efusões e, em 32% das vezes, as bactérias foram idênticas às identificadas nas efusões de crianças com OMA, mas em proporções diferentes, a saber: *H. influenzae* = 15%, *M. catarrhalis* = 10% e *S. pneumoniae* = 7%. A conclusão do estudo apontou para um aumento da prevalência do *S. pneumoniae* na OMA e para um aumento nas cepas de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* produtoras de β -lactamase, tanto na OMA quanto na OME.

Em 1992, SIH et al. avaliaram as EOM de 100 crianças norte-americanas com OME e OMR, sem sintomas de infecção aguda, e em 3% delas obtiveram crescimento do *A. otitidis*, utilizando cultura em ágar infuso de cérebro e coração + sangue de coelho a 5%. Esse crescimento ocorreu somente após 72 horas e a confirmação foi realizada através da PCR. Os autores concluíram pela necessidade de definir a prevalência e a distribuição geográfica do *A. otitidis*, elucidar seu papel na gênese da OME e na OMR, buscar sua presença na efusão da orelha média de pacientes com OMA e estabelecer a antibioticoterapia ideal para este germe multirresistente.

BOSLEY et al. (1995) estudaram 19 amostras de EOM de crianças com OMR, provenientes de quatro regiões geográficas distintas, sendo uma delas, São Paulo, Brasil. As amostras haviam sido enviadas ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), em Atlanta, EUA, rotuladas como material em que o exame bacterioscópico demonstrara a existência de germes, sob a forma de cocos, Gram-positivos, não-identificados. No CDC, os germes cresceram somente em *BHI – brain heart infusion* (infuso de cérebro e coração), não sendo isolados em outros meios convencionais. O crescimento inicial ocorreu após três dias de incubação a 37°C, e a bactéria foi identificada como o *A. otitidis*. Os achados foram confirmados com a técnica da PCR, tendo os autores questionado se as baixas taxas de culturas positivas nas EOM de OME e OMR aconteciam porque as efusões eram verdadeiramente estéreis ou porque ocorria falha no cultivo de microrganismos de crescimento lento, como o *A. otitidis*.

Também no CDC, MILLER et al. (1996) procuraram estabelecer as condições atmosféricas para o crescimento do *A. otitidis*, sob o argumento de que o germe teria uma importância na etiopatogênese da OME, e confirmaram as necessidades aeróbicas desta bactéria.

No Brasil, SAFFER et al. (1996) estudaram, com cultura convencional, 94 amostras de efusões obtidas da orelha média de 47 crianças com diagnóstico de OMEC, tendo havido crescimento de *S. epidermidis* em apenas uma ocasião, o que foi considerado resultante de contaminação da amostra. Em todas as outras amostras, tanto os resultados bacterioscópicos quanto os culturais foram negativos. Os autores sugeriram que a discordância de seus dados com os da literatura internacional poderia ser explicada por diferenças na temporalidade da execução da miringotomia.

JERO e KARMA (1997a) analisaram a bacteriologia da efusão na OME de crianças em quem essa efusão permaneceu por um período que variou de um a 12 meses. Identificaram exames culturais positivos em 41% das crianças menores de dois anos e em 17% daquelas maiores de dois anos ($P < 0,001$), com *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e *S. pyogenes* aparecendo em ordem decrescente. A proporção de *H. influenzae* (38%) e de *S. pneumoniae* (25%) foi maior nas crianças com menos de dois meses de persistência da efusão do que naquelas em quem a secreção permaneceu por tempo mais longo (3% e 8%, respectivamente), com um $P < 0,01$.

Novamente no Brasil, FILIZZOLA et al. (1998) avaliaram com cultura 51 aspirados obtidos da orelha média de 29 crianças com OMEC e obtiveram crescimento em 23,5% das amostras, com predominância do *S. aureus* (41,7%), seguido do *S. pneumoniae* (25,0%), *S. epidermidis* (16,7%), *H. influenzae* (8,3%) e *P. aeruginosa* (8,3%). Não houve isolamento de bactérias anaeróbicas.

Ainda no país, REZENDE et al. (1999) analisaram a secreção da orelha média de 30 crianças com OMEC, buscando a presença de bactérias por cultura convencional e de vírus por cultura de células e imunofluorescência indireta. Encontraram 33,6% de positividade bacteriana e 16,6% de positividade viral, ao passo que, simultaneamente, na nasofaringe, esses números foram 66,4% para a positividade bacteriana e 16,6% para a viral. Os germes mais freqüentemente encontrados nas efusões da orelha média foram *S. pneumoniae* (13,3%), *H. influenzae* (6,6%), *S. aureus* (6,6%), *M. catarrhalis* (3,3%) e *S. epidermidis* (3,3%). Houve crescimento concomitante de bactérias na orelha média e na nasofaringe em 16,6% dos casos.

HADDAD JR. et al. (2000) realizaram um estudo de coorte que incluiu 300 crianças submetidas à miringotomia por OMR e OMEC, no qual avaliaram a incidência e a suscetibilidade do *S. pneumoniae* por meio da análise de amostras de EOM e de secreção de nasofaringe. Pouco mais de um terço das amostras permitiu o isolamento de *H. influenzae* (27,3%), *S. pneumoniae* (7,6%) ou *M. catarrhalis* (10,6%). Do total de amostras com exame cultural positivo para a bactéria em estudo, 12 (52,2%) apresentaram *S. pneumoniae* resistente à penicilina. Adicionalmente, 41,5% dos *H. influenzae* e 90,6% das *M. catarrhalis* foram identificados como produtores de β -lactamase. Entre os fatores de risco apontados para a existência de pneumococo resistente à penicilina, apenas a pouca idade esteve associada com um estado de portador para este germe.

BROOK et al. (2000) estudaram a bacteriologia aeróbica e anaeróbica de crianças com OMEC e rinosinusite maxilar crônica. Cinquenta EOM foram obtidas de 32 pacientes, sendo que em 18 destes a aspiração foi realizada em ambas as orelhas. *H. influenzae* (9 isolados), *S. pneumoniae* (7), *S. aureus* (5) e *M. catarrhalis* (4) foram as bactérias aeróbicas mais freqüentemente encontradas e *Prevotella* sp (8), *Peptoestreptococcus* sp (6) e *Fusobacterium nucleatum* (3) os germes anaeróbicos mais prevalentes. Seus resultados apontaram uma concordância entre os achados culturais das efusões de orelha média e aspirados de seios maxilares em 69% das vezes. Os autores afirmaram que o estudo foi o primeiro a demonstrar uma concordância nos achados microbiológicos entre secreções de orelha média e de seios da face e que essa identificação simultânea embasa a hipótese de uma etiologia bacteriana comum para os processos infecciosos em ambos os locais.

SUTTON et al. (2000) buscaram determinar a prevalência de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis* resistentes à penicilina ao estudarem 355 efusões de orelha média de crianças submetidas à miringotomia por apresentarem OMEC (42,8% dos casos) e OMR (57,2%). Bactérias foram isoladas em 29,6% das amostras de EOM, nas seguintes proporções: *H. influenzae* = 12,1%, *S. pneumoniae* = 9,6%, *M. catarrhalis* = 5,6% e outras bactérias, geralmente não-patogênicas (*Staphylococcus* sp, *Pseudomonas* sp e *Neisseria* sp), em 2,3% das vezes. O *S. pneumoniae* mostrou-se resistente à penicilina em 38,2% e o *H. influenzae* e a *M. catarrhalis* produziram β -lactamase em 65,1% e 100% das amostras em que foram isolados, respectivamente. Os autores sugeriram que pouca idade era um fator preditivo para a ocorrência de cepas resistentes das bactérias estudadas.

Poucos estudos buscaram um papel causal para as bactérias anaeróbicas na OME. JOKIPPI et al. (1977) identificaram microrganismos anaeróbios em 30% das efusões de OMEC, mas esses eram sempre parte de uma flora mista, composta, em média, por quatro germes por efusão. BROOK et al. (1983) isolaram anaeróbios em 17% de 57 EOM oriundas de pacientes com OMEC, mas também aí havia predomínio de culturas onde o germe estava junto com microrganismos aeróbios. GIEBINK et al. (1979) e TEELE et al. (1980) não encontraram germes anaeróbios em mais de 170 amostras de efusões de OMEC, sendo que GIEBINK (1989b) afirmou existir um consenso de que bactérias anaeróbias não desempenham um papel primordial na patogênese da OMEC. Recentemente, BROOK et al. (2001) correlacionaram os resultados da análise microbiológica das amostras de EOM de 114 crianças com OME com a idade destes pacientes e o tempo de permanência da efusão. O exame cultural foi positivo em 41% das amostras, sendo que 57% destes isolados se constituíram exclusivamente de bactérias aeróbicas, 15% de anaeróbicas e 28% de flora

mista. A identificação geral de bactérias foi mais freqüente em amostras obtidas de crianças menores de dois anos de idade. O *H. influenzae* e o *S. pneumoniae* foram mais encontrados em efusões de crianças menores de dois anos ($P < 0,05$) e, quanto ao tempo de existência da efusão, estes patógenos foram mais isolados no grupo em que a permanência documentada era de 3-5 meses do que no grupo em que a efusão já existia por 6-13 meses ($P < 0,05$). Já os germes anaeróbios foram identificados mais freqüentemente em pacientes que apresentavam efusão na orelha média por mais de seis meses e naqueles com mais de dois anos de idade. Os autores consideraram uma possível ocorrência de transição de flora aeróbica para anaeróbica na OME.

2.3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida na década de 80 e consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA ou RNA de uma seqüência nucleotídica predeterminada (SAIKI et al., 1985, 1986; MULLIS e FALOONA, 1987; KWOK et al., 1987; SAIKI et al., 1988; ABBOTT et al., 1988; BHAGAVATI et al., 1988; EHRLICH et al., 1989).

A PCR surgiu como uma técnica muito poderosa para a detecção de quantidades pequenas de DNA e RNA de vírus e bactérias. É rápida, sensível e específica, encontrando crescente aplicação na identificação de agentes infecciosos (PITKARANTA et al., 1998; OGRA et al., 1998).

Quanto às bactérias, a técnica foi inicialmente utilizada para o estudo de germes de crescimento lento e não-cultiváveis (WILSON et al., 1990; RELMAN et al., 1990; WILSON et al., 1991; FRY et al., 1991). Posteriormente, foi empregada para detectar ácidos nucleicos de bactérias que não costumam impor dificuldades no cultivo, em amostras que se mostravam estéreis pelas técnicas de cultivo tradicionais ou que não permitiam cultura. (VAN KETL et al., 1990; HYKIN et al., 1994; LIEBLING et al., 1994).

A PCR vem sendo utilizada para a amplificação do DNA de vários microrganismos potencialmente patogênicos para o trato respiratório, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophilla* e *Pneumocystis carinii* (RUDOLPH et al., 1993; FRITSCHER, 1993; POST et al., 1995; RAMIREZ et al., 1996; IEVEN e GOOSSENS, 1997; MENÉNDEZ et al., 1999; ZETTLER, 2000).

Recentemente, essa técnica de biologia molecular vem sendo empregada com frequência no estudo da efusão da orelha média, mais especificamente em amostras culturalmente estéreis. Algumas pesquisas, como a de VIROLAINEN et al. (1994), estudaram amostras de efusões oriundas de crianças com OMA e, mesmo nestas, demonstraram aumentos de até 154% na identificação bacteriana, ao ser a PCR comparada com o exame cultural. Já as efusões presentes nas OME, que permitem identificação bacteriana por cultura convencional em somente 20-40% das vezes, têm sido objeto de vários estudos com a PCR.

AGUIRRE E COLLINS (1992a), após a identificação do *Alloiococcus otitidis* por meio de cultura convencional, e tendo reconhecido a dificuldade de seu isolamento, desenvolveram uma técnica rápida de PCR que amplificou seqüências específicas de bases

no gene 16S rRNA do germe e que eram depois detectadas por meio da eletroforese em gel. Os autores justificaram o desenvolvimento da técnica tendo em vista o potencial papel patogênico do microrganismo na gênese da OME.

Em 1993, no Japão, HOTOMI et al. estudaram amostras de 27 EOM de 25 crianças (idade média de 5,4 anos) com OME de mais de um mês de duração e sem sintomas de infecção aguda. O objetivo da pesquisa era comprovar a utilidade da PCR na detecção do *H. influenzae* nas efusões de orelha média, pois a técnica poderia mostrar-se superior à cultura na identificação de germes potencialmente envolvidos na gênese das doenças crônicas da orelha. Usaram-se aspiradores descartáveis e classificaram-se as efusões em mucóides (21), serosas (3) e seromucóides (3). DNA do microrganismo foi detectado em 55,6% das efusões e não houve resultado positivo por meio do exame cultural concomitante, com meios de ágar sangue e ágar chocolate. Os autores sugeriram que a bactéria não foi encontrada pela bacteriologia convencional devido à pequena quantidade de colônias, a limitações técnicas e à multiplicação bacteriana dificultada pela ligação com IgA secretora. Concluíram afirmando que o trabalho demonstrava um envolvimento do *H. influenzae* na etiopatogênese da OME bem maior do que o considerado até então, e comprovava a alta sensibilidade e especificidade da PCR.

Confirmando a contribuição de grupos de Pittsburgh (EUA) para o estudo das doenças da orelha média em crianças, POST et al. (1995) realizaram um estudo cego e comparativo de métodos diagnósticos para determinar se a PCR poderia identificar DNA bacteriano em EOM eventualmente estéreis pela cultura convencional. Uma técnica de PCR para detecção de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* e cultura em meios de ágar sangue, ágar chocolate e ágar sangue de carneiro foram utilizadas para avaliar 97 EOM de

crianças entre nove a 172 meses (média de 42 meses), portadoras de OMEC, com um mínimo de três meses de permanência da secreção e que tiveram indicação de miringotomia e colocação de tubo de ventilação. Os pacientes haviam sido submetidos a vários cursos de antibióticos, mas não foi referido o período transcorrido desde a última utilização. Das 97 amostras de efusões, 28,9% foram simultaneamente positivas por cultura e PCR para uma ou mais das bactérias estudadas, e 48,4% foram positivas somente por PCR. Assim, 77,3% das EOM foram positivas para DNA bacteriano pela técnica da PCR. Essa técnica aumentou em 892% a identificação da *M. catarrhalis*, em 253% a do *H. influenzae* e em 575% a do *S. pneumoniae*, ou um aumento geral de 268% na identificação de um ou mais dos três germes testados, quando comparada com o exame cultural. Isso levou os autores a concluir que os dados gerados sugeriam, mas não provavam, que bactérias viáveis estariam presentes nas EOM de pacientes com OME num percentual muito maior do que até então suposto.

No Japão, UHEYAMA et al. (1995), coletaram amostras de secreção de nasofaringe de 102 pacientes com OME e de 111 pessoas saudáveis. Também obtiveram amostras de secreção da orelha média de 65 indivíduos, dentre os com OME. Não especificaram a idade dos sujeitos, o tempo de permanência da efusão na orelha média e tampouco informaram acerca do uso de antibióticos. Analisaram as amostras através da cultura em meios de ágar sangue e ágar chocolate e da PCR específica para amplificar um segmento de DNA da membrana externa do *H. influenzae*. A PCR identificou o germe com frequência duas vezes maior do que a cultura quando analisaram amostras da nasofaringe e cinco vezes maior quando estudaram EOM, com diferenças estatisticamente significativas.

Todas as amostras com positividade no exame cultural foram PCR (+) e todos os pacientes que apresentavam a bactéria na EOM também a possuíam na nasofaringe.

Numa carta ao editor, CANTEKIN (1996) fez críticas à pesquisa de Post e colaboradores citada anteriormente, referindo-se à presença de DNA bacteriano em amostras de EOM como “meros restos fossilizados”, sem, no entanto, comprovar sua teoria.

Como se respondesse a Cantekin, POST et al. (1996a) buscaram determinar se o achado de DNA bacteriano em efusões de orelha média culturalmente estéreis indicaria a presença de germes viáveis ou apenas a persistência de DNA residual. Usando o modelo de otite média experimental em chinchilas, as orelhas médias de um grupo de animais foram inoculadas com colônias de *H. influenzae* vivos, colônias de *M. catarrhalis* inativadas pelo calor e DNA purificado de *S. pneumoniae*. Um segundo grupo teve as orelhas inoculadas com colônias de *S. pneumoniae* vivos, colônias de *M. catarrhalis* inativadas pelo calor e DNA purificado de *H. influenzae*. Sendo as cepas de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* sensíveis à ampicilina, os animais foram tratados com esta droga durante cinco dias, a partir do terceiro dia da inoculação, com a presença da efusão comprovada desde o dia anterior. A *M. catarrhalis* inativada e as preparações de DNA purificados foram previamente testadas para demonstrar a capacidade de suportar a amplificação pela PCR. O DNA de bactérias vivas foi identificado até o dia 21, apesar de todas as amostras de EOM terem se mostrado negativas por cultura após o início do tratamento com antibiótico. Já o DNA oriundo das bactérias inativadas pelo calor e o DNA purificado foram identificados somente até o terceiro dia do experimento. Os autores afirmaram que os dados sugeriam que as EOM possuíam mecanismos muito eficientes para a remoção de bactérias inativadas, bem como um processo rápido de degradação de DNA e que a persistência de bactérias vivas, mas não

cultiváveis, poderia ser um dos fatores a contribuir para a manutenção da efusão na orelha média. Concluíram dizendo que os resultados mostravam que DNA purificado e DNA de germes intactos, mas inativados, não persistem na EOM, mesmo após a inoculação em grande quantidade, contrariando a teoria do “DNA residual ou fossilizado” e que tal fato sugeria fortemente que os achados de DNA bacteriano amplificáveis pela PCR era indicativo de infecção ativa.

JERO et al. (1996) compararam um método de PCR para detectar o *S. pneumoniae* com o exame cultural em 123 amostras de EOM de crianças com OME, as quais haviam sido submetidas à miringotomia e não haviam recebido antibióticos na semana anterior ao procedimento. A PCR empregou um método de extração comercial do DNA, denominado QIAamp[®]. A cultura foi positiva para o germe em 11% das vezes, e o PCR identificou DNA bacteriano em 46% das EOM. Todas as amostras que tiveram cultura positiva também apresentaram PCR positiva. A positividade, tanto por cultura quanto por PCR, foi maior nas EOM de crianças com menor duração da OME e com menos de dois anos de idade.

O desenvolvimento de técnicas de PCR simultâneo (*multiplex* PCR) foi comunicado por POST et al. (1996b) e pelo grupo finlandês de HENDOLIN et al. (1997), para identificação de *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e *A. otitidis*. A escolha dos germes foi justificada pela sua prevalência nas diversas formas de otite média e pela provável importância do *A. otitidis* na gênese da OME. O trabalho de Hendolin e colaboradores estudou 25 amostras de EOM obtidas em 16 crianças com OME, com idade média de três anos, sem excluir o uso de antibioticoterapia. A comparação com os resultados de cultura convencional mostrou que a PCR aumentou em 225% o número de

amostras positivas para um dos germes estudados. A técnica proposta pelos finlandeses, baseada na amplificação de seqüências do gene 16S rRNA das bactérias é de execução mais rápida e foi a única que incluiu o *A. otitidis*, germe de difícil cultivo.

Vários artigos relacionados à PCR e OME foram publicados em 1998. Em Pittsburgh (EUA), RAYNER et al. (1998), prosseguindo no caminho de esclarecer se o DNA bacteriano encontrado na EOM pela PCR indicaria a presença de germes viáveis, buscaram determinar se o RNA mensageiro (mRNA) da bactéria, que tem vida média de segundos a minutos, estaria presente nas amostras de EOM que contêm DNA mas são negativas na cultura. Para isso, estabeleceram um estudo cego e comparativo de 93 amostras de EOM de crianças submetidas à miringotomia e à colocação de tubo de ventilação por OMEC. A PCR por transcriptase reversa (RT-PCR) foi desenvolvida para buscar o mRNA de um componente essencial do metabolismo do *H. influenzae*. Um total de 29 (31%) das amostras foi positivo para o DNA bacteriano pela PCR, mas negativo por cultura, tendo todas essas sido também positivas para o mRNA do germe, por meio da RT-PCR. Houve uma tendência altamente significativa ($P < 0,001$) para que as amostras negativas no exame cultural fossem positivas para a bactéria quando testadas com a RT-PCR. O método estudado aumentou em 264% o número de amostras com resultado positivo para o *H. influenzae*, quando comparado com a cultura convencional. Argumentando que o mRNA é uma molécula rapidamente degradada, com uma vida média medida em segundos e minutos, entenderam os autores que todos as amostras que foram positivas pela RT-PCR continham bactérias intactas e metabolicamente ativas. Além disso, como todos os resultados de PCR positivos para o DNA do germe também foram positivos para o mRNA

através da RT-PCR, existiria aí forte evidência de que a identificação do DNA bacteriano indicaria a existência de microrganismos metabolicamente viáveis.

No Líbano, MATAR et al. (1998) utilizaram uma técnica de PCR simplificada, com *primers* específicos para *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, semelhante àquela empregada por Hendolin e colaboradores em 1997. Aliando essa técnica ao exame cultural, estudaram 47 EOM de 36 crianças com OME de mais de dois meses de duração que haviam sido submetidas à miringotomia e à colocação de tubo de ventilação. Os resultados mostraram um total de 74,5% de amostras de EOM com positividade na PCR e 21,3% com positividade na cultura. Todas as amostras com resultados culturais positivos também foram positivas pela PCR para a mesma bactéria. O *H. influenzae*, a *M. catarrhalis* e o *S. pneumoniae* foram identificados pela PCR em 70,2%, 21,3% e 6,4%, respectivamente, ao passo que somente em 19,1%, 4,3% e 0% pelo exame cultural. Os autores sugeriram que a baixa frequência de identificação pelo exame cultural poderia ser explicada pelo número pequeno de colônias bacterianas ($< 10^4$ CFU/ml) encontradas nas efusões de OME, situação esta já documentada por STENFORS e RAISANEN (1990).

AUL et al. (1998), usando uma vez mais o modelo de otite média em *Chinchilla laniger*, delinearam pesquisa para determinar a persistência de positividade por cultura e PCR após uma infecção experimental, bem como para estudar de que forma um inóculo de bactérias vivas e em baixo número afetaria a duração dessa positividade. Para isso, 155 chinchilas foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo teve as orelhas médias inoculadas com *H. influenzae* resistentes à penicilina, e o segundo recebeu um inóculo triplo de *S. pneumoniae* sensível à penicilina em baixa contagem de CFU (unidades formadoras de colônias), *M. catarrhalis* inativada pelo calor e DNA puro de *H. influenzae*.

Todos os animais foram tratados com ampicilina por três dias a contar do terceiro dia do experimento. O primeiro grupo mostrou positividade por cultura e PCR até o dia 35, com concordância muito boa entre os métodos, inclusive na diminuição do percentual de positividade que aconteceu ao longo do tempo. No segundo grupo, os DNA da *M. catarrhalis* inativada e os DNA puros de *H. influenzae* não foram identificados pela PCR além do dia três. Já o DNA amplificado dos *S. pneumoniae* em baixa contagem persistiu, sendo identificado pela PCR até o dia 21, apesar de o exame cultural não ser positivo além do dia três. Os autores concluíram afirmando que os dados demonstravam que DNA bacteriano puro e DNA de bactérias intactas mas inativadas não persistem na efusão de orelha média sob forma amplificável por mais de três dias, reiteradamente contrariando a teoria do “DNA residual ou fossilizado”, ao passo que bactérias vivas, mesmo não mais cultiváveis após tratamento com antibiótico, persistem em estado viável por algumas semanas.

DINGMAN et al. (1998), partindo do princípio de que a identificação de DNA bacteriano nas EOM representa a presença de bactérias viáveis e metabolicamente ativas, buscaram comparar a presença da endotoxina, um complexo lipossacarídico localizado na superfície externa da maioria das bactérias gram-negativas, com a presença de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* viáveis. Para isso, estudaram amostras de 106 EOM de pacientes entre três meses e 13 anos que haviam sido submetidos à miringotomia por apresentarem persistência da efusão por mais de três meses (OMEC). A endotoxina foi encontrada em 76% das amostras de EOM e, destas, 82% foram também positivas pela PCR para uma das duas bactérias. Por isso, entenderam os autores que bactérias viáveis, mas não-cultiváveis, podem ser a origem das endotoxinas, e concordaram com a idéia de

que estas últimas são fortemente responsáveis pela efusão na OME, como já demonstrado por DeMARIA et al. (1984).

As contribuições provenientes da Finlândia retornam, em 1999, com dois estudos. HENDOLIN et al. (1999) aperfeiçoaram sua técnica de PCR simultâneo para quatro bactérias e analisaram 67 amostras de EOM de 48 crianças (idade média de três anos e oito meses), com OME (duração média da efusão de 2,5 meses), sem sintomas respiratórios agudos, mas eventualmente usando antibióticos, que haviam sido submetidas à miringotomia. A PCR identificou uma ou mais bactérias em 85,1% das EOM, sendo que o *A. otitidis* foi encontrado em 46,3% ocasiões, a *M. catarrhalis* em 37,3%, o *S. pneumoniae* em 20,9% e o *H. influenzae* em 17,9%. A técnica foi significativamente mais sensível que a cultura, sendo que o *A. otitidis* não foi isolado culturalmente. Entre as 19 amostras de efusões de crianças que estavam usando antibióticos ou tinham-nos utilizado recentemente, 14 foram PCR (+), mas apenas uma foi positiva por cultura. O *A. otitidis* foi identificado em associação com uma das outras três espécies mais freqüentemente do que as outras espécies entre si ($P < 0,001$). Os autores concluíram que os achados confirmavam a maior capacidade da PCR em identificar bactérias na EOM, quando comparada com o exame cultural, apontaram uma etiologia bacteriana para a OME e indicaram que a freqüente associação do *A. otitidis* com outras bactérias sugeriria uma capacidade para aumentar a colonização da orelha média. Já JERO et al. (1999) buscaram aumentar o conhecimento sobre o papel do *A. otitidis* no *continuum* da otite média, tendo, para isso, estudado com PCR efusões da orelha média de crianças com OMA e OME. Encontraram o germe em 18% das amostras de EOM de OMA e em 20% daquelas provenientes de crianças com OME. Não evidenciaram qualquer correlação entre a presença do *A. otitidis* e o quadro

clínico da OMA e sua evolução. Quanto à OME, a bactéria foi identificada em 8% dos casos em que a EOM persistia por menos de três meses e em 25% dos casos em que estava presente por um período maior. Além disso, o germe foi mais frequentemente identificado em efusões mucóides (30%) do que em serosas ou mucopurulentas (10%) e em amostras colhidas de crianças maiores de dois anos de idade. Entenderam os autores que os resultados sugeriam que o *A. otitidis* não tem significado importante na patogênese e quadro clínico da OMA, mas deve atuar como iniciador e perpetuador dos quadros de OME.

Na Inglaterra, BESWICK et al. (1999) confirmaram a alta prevalência do *A. otitidis* (50%) em EOM ao estudar, com PCR, amostras de efusão obtidas em 12 pacientes com OMEC. O germe aparecia isoladamente ou em associação com outras bactérias, e o exame cultural não rendeu resultado positivo em qualquer das EOM.

HENDOLIN et al. (2000), ao propor pequenas modificações na técnica do PCR simultâneo para quatro patógenos da orelha média, estudaram 73 amostras de EOM de crianças com OME e voltaram a encontrar um percentual elevado (93,2%) de positividade para *A. otitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*. Parte das amostras de EOM teve a extração do DNA efetivada com fenol e a outra fração teve este processo realizado com o *kit* comercialmente disponível QIAamp[®]. A extração com fenol identificou mais germes Gram-negativos (*H. influenzae* e *M. catarrhalis*) do que aquela obtida com o QIAamp[®] (P<0,001), e o inverso aconteceu com as bactérias Gram-positivas (*A. otitidis* e *S. pneumoniae*), quando, então, o QIAamp[®] foi superior (P<0,001). Apesar disso, os autores concluíram que variações sazonais e de técnica podem influenciar os resultados.

PEIZHONG et al. (2000), na Inglaterra, após afirmarem que o DNA detectado nas efusões de orelha média poderia originar-se de “restos fossilizados” provenientes de infecções anteriores, buscaram demonstrar que a efusão estaria protegendo o DNA bacteriano da degradação provocada por enzimas (DNAses). Usando um método de avaliação da viscosidade não detalhado, os autores concluíram que a EOM inibia a ação das enzimas citadas e, conseqüentemente, que o DNA bacteriano detectado pela PCR poderia não representar bactérias viáveis.

Na Turquia, GOK et al. (2001) estudaram 37 amostras de EOM de 20 crianças com OME que haviam sido submetidas à miringotomia. A técnica de PCR simultâneo foi aplicada para detectar *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, de forma já descrita por MATAR et al (1998). Obtiveram 24,3% de positividade por cultura convencional e 94,5% de positividade pela PCR (diferença na positividade estatisticamente significativa, $P < 0,001$), com leve predomínio do *H. influenzae* sobre o *S. pneumoniae*, e menos identificação da *M. catarrhalis*. Em 17 (48,5%) das 35 amostras de EOM com resultados positivos pela PCR, encontraram associações entre as bactérias estudadas.

Do Japão, com HARIMAYA et al. (2001), vem um dos dois únicos relatos por nós encontrados de identificação do *A. otitidis* em amostras de efusão de OMA. Esses pesquisadores analisaram 12 amostras de EOM provenientes de seis crianças com OMA e de outras seis com OME. A PCR identificou o germe em 50% das amostras, sendo quatro oriundas de efusões de OMA e duas de OME. O exame cultural não identificou o microrganismo em qualquer das amostras e a análise por *Western blot* detectou anticorpos específicos contra o *A. otitidis* em todas as efusões onde a PCR encontrou DNA da bactéria.

LESKINEN et al. (2002) procuraram determinar a presença e o papel do *A. otitidis* na OME. Para isso, avaliaram 123 amostras de EOM de crianças entre 7 meses e 12 anos de idade (mediana = 2,5 anos) com OME de mais de um mês de duração (mediana = 3,5 meses), sem sinais de OMA ou outras infecções respiratórias agudas. Amostras de efusões purulentas foram excluídas da pesquisa. O exame cultural convencional isolou bactérias em 45% das amostras de EOM e *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* foram encontrados em 33% das secreções. O *A. otitidis* não cresceu em cultura. A PCR simultânea para quatro bactérias detectou DNA de um ou mais dos germes em 88% das vezes, e o *A. otitidis* foi identificado em 25 (20%) do total de efusões. As EOM que persistiam por mais de três meses tinham uma prevalência maior desta bactéria do que aquelas de menor duração (P=0,03). Como informação adicional, o pneumococo foi mais identificado em efusões de crianças com menos de dois anos do que em crianças maiores (P=0,04), sem que tivessem sido encontradas variações com significado estatístico nas prevalências do hemófilos e da moraxela nos diferentes grupos etários. Os autores concluíram que o *A. otitidis*, por ser de difícil isolamento pelo exame cultural, deve ser pesquisado pela técnica da PCR e que, pelo fato de ter sido encontrado em efusões de maior duração, está provavelmente associado a estágios mais crônicos de OME.

2.3.3 Resistência Bacteriana

O perfil de resistência dos microrganismos às drogas antimicrobianas tem mudado nos últimos anos, tornando-se uma preocupação mundial. Houve um aumento na

prevalência do *S. pneumoniae* resistente à penicilina e no percentual de cepas de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* produtoras de β -lactamase (McCRACKEN JR., 1998).

Streptococcus pneumoniae

Os pneumococos resistentes à penicilina são muito mais comuns em crianças e passaram a ser causas importantes de fracasso terapêutico naquelas portadoras de otite média. A resistência é produzida por modificações nas proteínas da membrana citoplasmática da bactéria às quais a penicilina normalmente se liga, resultando em menor afinidade pelas drogas β -lactâmicas. Quanto maior o número de alterações nas proteínas que se ligam à penicilina, maior é o nível de resistência às penicilinas e cefalosporinas. A resistência do pneumococo a outros antibióticos, particularmente à eritromicina e ao sulfametoxazol-trimetoprim também tem aumentado nas regiões em que prevalecem cepas penicilino-resistentes, apesar de a resistência aí ocorrer por mecanismos diferentes. A resistência a estes agentes e às cefalosporinas frequentemente co-existe em cepas altamente resistentes à penicilina (KLEIN, 1999).

Atualmente, a resistência do *S. pneumoniae* à penicilina é subdividida em resistência intermediária (CIM entre 0,12 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$) e resistência plena (CIM $\geq 2,0$ $\mu\text{g/ml}$). O conceito de concentração inibitória mínima (CIM) remete-nos à concentração mínima de um determinado antimicrobiano que inibe, *in vitro*, o crescimento de uma bactéria. A habilidade de um antibacteriano erradicar bactérias da orelha média depende da sua concentração na mucosa desse local. Ele precisa chegar até a orelha média em concentrações acima da CIM necessária para eliminar determinada bactéria e manter-se acima destes valores por, no mínimo, 40-50% do tempo entre os intervalos das doses

administradas (CRAIG, 1998). A maioria das cepas de pneumococo penicilino-resistente demonstra resistência intermediária, sendo ainda sensível a doses elevadas da droga (McCRACKEN JR., 1998).

Os fatores de risco para colonização e infecção por pneumococos resistentes incluem a exposição prévia a antibióticos, pouca idade, frequência à creche e história de hospitalização. O desenvolvimento de resistência acontece por meio da transferência de material genético a partir de estreptococos taxonomicamente relacionados que habitam a nasofaringe (KLEIN, 1999).

A resistência à penicilina por parte do pneumococo foi inicialmente identificada como um problema com repercussões clínicas na década de 70, em crianças sul-africanas e australianas (HANSMAN et al., 1971; JACOBS et al., 1978). Posteriormente, cepas de pneumococo resistentes à penicilina foram reconhecidas em todo o mundo, e são particularmente prevalentes em alguns países.

Na Europa, a incidência do pneumococo penicilino-resistente é preocupante, principalmente na Espanha, onde houve um crescimento de 6%, em 1979, para 71%, em 1997 (FENOLL et al., 1991; GARCÍA-MARTOS et al., 1997). Taxas elevadas, ultrapassando 40%, também foram encontradas na França e Hungria (KLEIN, 1999). Na Ásia, a situação é semelhante, com índices de 78% de germes resistentes à penicilina na Coreia e Extremo Oriente (KIM et al., 1996). Já nos EUA, a incidência varia consideravelmente de acordo com a época e as diferentes regiões, apresentando níveis entre 10 e 62% (COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1997; JACOBS et al., 1999). Em contraste, a resistência à penicilina pelo

pneumococo permanece em patamares muito baixos, entre 1–5%, em alguns países europeus, como a Suécia e a Holanda (HEDLUND et al., 1995; HERMANS et al., 1997).

JACOBS et al. (1999) mostraram como as variações geográficas, etárias e de sítios de infecção podem influenciar as taxas de pneumococo penicilino-resistente. Em seis diferentes regiões dos EUA, os números variaram entre 36 a 62%; em relação à faixa etária as variações foram de 37% em crianças entre três e dez anos de idade a 58% em menores de dois anos; e, quanto ao sítio infeccioso, de 38% nas infecções oftalmológicas até 60% nas otites médias e nas rinosinusites.

Estudando especificamente a prevalência de patógenos nas OMA, JACOBS et al. (1998) utilizaram dados obtidos nos EUA, Europa Central e Leste e Israel, tendo encontrado uma taxa de 30% de pneumococos resistentes à penicilina. Já a análise de efusões de OMA realizada em Israel, em diferentes períodos, mostrou que a prevalência de pneumococo penicilino-resistente aumentou de 10% em 1992, para 58% em 1998 e 71% em 1999 (GOLDBART et al., 1997; DAGAN, 2000; DAGAN et al., 2000). Estudos específicos com efusões de OME demonstraram taxas entre 38 e 70% de *S. pneumoniae* resistentes (SUTTON et al., 2000; HADDAD JR. et al., 2000; SIH, 2002).

No Brasil, os primeiros relatos de resistência à penicilina por parte do *S. pneumoniae* datam de 1988 (DE SOUZA MARQUES et al., 1988). Um dos primeiros estudos que monitorizou a susceptibilidade do pneumococo em nosso país, no período entre 1988-92, encontrou um percentual de 28,7% de germes resistentes (SESSEGOLO et al., 1994). Em São Paulo, LEVIN et al. (1996) apontaram níveis semelhantes. O Programa SENTRY de Vigilância de Resistência, analisando informações de hospitais brasileiros e de outros países latino-americanos, encontrou níveis de resistência de 24% (SADER et al.,

1998). Em contraste, a avaliação de dados provenientes de pacientes ambulatoriais do Rio de Janeiro, São Paulo e Florianópolis, apontou um índice 40,4% de *S. pneumoniae* resistente à penicilina (SADER et al., 1999). Estudo multicêntrico latino-americano, realizado pelo *Sireva Group* no período de 1993-99, revelou uma taxa média de pneumococo resistente de 22,3% em várias cidades brasileiras (DiFABIO et al., 2001). A análise exclusiva de efusões de OMA em nosso país detectou 56,2% de *S. pneumoniae* com resistência intermediária à droga (SIH, 2001).

Especificamente no estado do Rio Grande do Sul, CHATKIN et al. (1989), avaliando dados de pacientes com pneumonia, identificaram 3,2% de pneumococos resistentes e ZETTLER (2000), analisando amostras de escarro, encontrou uma taxa de 22,8% de resistência.

Haemophilus influenzae

As cepas de *H. influenzae* não identificáveis sorologicamente (NTHi) apresentam-se como causas importantes de otite média, raramente invadindo a corrente sanguínea. O mecanismo de resistência dessa bactéria a drogas β -lactâmicas reside na produção de uma enzima denominada β -lactamase, a qual hidrolisa a penicilina G e V, a ampicilina e a amoxicilina. O anel β -lactâmico é quebrado, o que torna a droga inativa. A resistência causada pela produção de β -lactamase é absoluta, diferentemente da resistência do pneumococo à penicilina, que pode ser vencida pelo aumento da concentração da droga no local da infecção. A resistência às penicilinas pode também dever-se a um defeito de permeabilidade ou à alteração das proteínas que se ligam às penicilinas, mas a incidência desse tipo de resistência é atualmente muito baixa, ao redor de 5% (KLEIN, 1999).

Cepas de NTHi resistentes foram inicialmente isoladas no começo da década de 70 e, no período de 80-90, 20-30% dos hemófilos isolados de crianças com otite média eram β -lactamase positivos (BLUESTONE et al., 1992). Num estudo multicêntrico (EUA, Europa Central e Leste e Israel) realizado no período 1994-95, com efusões de OMA em crianças, 31% dos NTHi eram produtores de β -lactamase (JACOBS et al., 1998). Nos EUA, estudando a microbiologia da OME, SUTTON et al. (2000) e SIH (2002) detectaram NTHi β -lactamase positivos em 55 e 65% do total de hemófilos isolados, respectivamente. Em Paris, GEHANNO et al. (2001) encontraram taxas de resistência aos β -lactâmicos de 70% entre *H. influenzae* isolados de pacientes com otite média.

No Brasil, o Programa SENTRY detectou 11,8% de NTHi resistentes à penicilina ao analisar amostras provenientes de infecções do trato respiratório (SADER et al., 1999). Estudo multicêntrico, que incluiu amostras do Rio Grande do Sul, apontou 10,6% de NTHi β -lactamase positivos (CRITCHLEY et al., 2001). A avaliação específica de efusões de OMA em nosso país encontrou 14% de *H. influenzae* produtores de β -lactamase (SIH, 2001).

Moraxella catarrhalis

As cepas de *M. catarrhalis* eram suscetíveis à penicilina até a década de 70, mas atualmente mais de 90% são produtoras de β -lactamase, tornando-se, assim, penicilino-resistentes (BAUMANN et al., 1968; WALLACE et al., 1990; GEHANNO et al., 2001). O seu mecanismo de resistência dá-se por meio da produção da enzima β -lactamase, semelhante ao apresentado pelo *H. influenzae*. Essas β -lactamases têm espectro amplo, mas exercem seu maior efeito contra a penicilina e a ampicilina. Por outro lado, as

cepas produtoras de β -lactamase são inibidas por amoxicilina com ácido clavulânico, cefixime, cefuroxime e ceftriaxone e também por agentes não beta-lactâmicos, como o trimetoprim-sulfametoxazol, a ciprofloxacina e a eritromicina (VERGHESE, 1997).

Há evidências de que a capacidade de produzir β -lactamase foi adquirida recentemente na história deste microrganismo. A produção dessa enzima foi relatada pela primeira vez em 1977, na Suécia, França e Inglaterra (VERGHESE, 1997). Na grande área de Pittsburgh (EUA), a análise das efusões de crianças com OMA e OME já apresentava uma prevalência de 100% de cepas penicilino-resistentes no final da década de 80 (BLUESTONE et al. 1992). Estudos específicos com amostras de efusões de OME demonstraram taxas entre 90% e 100% de *M. catarrhalis* β -lactamase positivas (HADDAD JR. et al., 2000; SUTTON et al., 2000; SIH, 2002).

No Programa SENTRY e no Projeto ALEXANDER, que reuniram dados combinados de vários países, incluindo o Brasil, as taxas de moraxela penicilino-resistentes foram 89% e 91,6%, respectivamente (SADER et al., 1999; FELMINGHAM e GRUNEBERG, 2000).

A avaliação específica de efusões de OMA em nosso país encontrou 100% de *M. catarrhalis* produtoras de β -lactamase (SIH, 2001).

Alloiococcus otitidis

A resistência aos antimicrobianos por parte do *A. otitidis* ainda não é bem conhecida, o que é coerente com o recente papel a ele atribuído na gênese das infecções crônicas da orelha média. O germe, apesar de não ter sido caracterizado como produtor de β -lactamase, apresentou níveis intermediários de resistência aos agentes β -lactâmicos,

incluindo aí cefalosporinas de amplo espectro e mostrou-se resistente à eritromicina e ao sulfametoxazol-trimetoprim (BOSLEY et al., 1995).

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A otite média com efusão (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 (JUHN et al., 1977; GIEBINK, 1989a).

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 frequentemente encontradas nessas culturas são o *Streptococcus pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis* (RIDING et al., 1978; GIEBINK et al., 1982; MEYERHOFF & GIEBINK, 1982; KRENKE et al., 1988; GIEBINK, 1989b; BLUESTONE et al., 1992; SUTTON et al., 2000). Há pouco tempo, técnicas de PCR foram adaptadas para detecção de DNA bacteriano nas efusões de orelha média, e sua utilização elevou para perto de 90% a frequência com que se encontrou positividade para estes microrganismos nas efusões examinadas (HOTOMI et

al., 1993; POST et al., 1995; UEYAMA et al., 1995; JERO et al., 1996; HENDOLIN et al., 1997; MATAR et al., 1998; LIEDERMAN et al., 1998; HENDOLIN et al., 2000).

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 PCR (HENDOLIN et al., 1997; BESWICK et al., 1999; HENDOLIN et al., 1999; TARKKANEN et al., 2000; HENDOLIN et al., 2000).

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*, *M. catarrhalis* e *A. otitidis*.

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 as complicações que requeiram cirurgias.

O estabelecimento de dados mais precisos e atualizados sobre a epidemiologia bacteriana local poderá ser útil na definição de tratamentos direcionados à nossa população, na identificação dos níveis de resistência frente aos antimicrobianos e na diminuição de possíveis malefícios vinculados às aplicações de regimes terapêuticos preconizados por estudos realizados em outros países.

As informações relativas à prevalência de bactérias na OME, obtidas mediante a aplicação de técnicas microbiológicas convencionais, são escassas no Brasil, e não encontramos na revisão de literatura realizada quaisquer pesquisas nacionais baseadas na técnica da PCR, para os mesmos fins acima mencionados.

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de aumentar nosso conhecimento sobre a microbiologia da efusão da orelha média de crianças com OMR e OMEC e comparar os resultados obtidos pela cultura convencional com aqueles obtidos por PCR.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Determinar a prevalência de bactérias na efusão da orelha média de crianças com OME que foram submetidas à miringotomia.

4.2 Específicos

- Comparar os resultados obtidos no exame cultural com aqueles obtidos pela PCR, relativos ao *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Alloiococcus otitidis*.
 - Investigar a presença do *A. otitidis* por meio da PCR e comparar sua frequência com a de outros patógenos;
-

-
- Comparar a frequência e o tipo de germe encontrados em pacientes com OMR e OMEC.
 - Comparar os achados bacteriológicos em crianças menores e maiores de dois anos.
 - Determinar a resistência à penicilina ou a produção de β -lactamase do *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *A. otitidis*, quando isolados pelo método cultural.
-

5 PACIENTES E MÉTODOS

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Delineamento do Estudo

Estudo transversal, observacional, contemporâneo, com dados sub-individuais (orelhas), para avaliar a prevalência dos principais microrganismos presentes nas efusões de crianças com OME.

O fator em estudo foi constituído pelas efusões observadas na OME e o desfecho foi a presença ou não de bactérias.

5.2 Características da Amostra Estudada

A seleção da amostra foi de conveniência e consecutiva. A amostra foi coletada de crianças que apresentavam efusão na orelha média, com diagnóstico de OMR ou OMEC e que foram submetidas à miringotomia e à colocação de tubo de ventilação, no

período de junho de 2001 até outubro de 2002, todas provenientes de clínica de otorrinolaringologia infantil de Porto Alegre, que atende pacientes particulares e beneficiários do sistema cooperativado UNIMED.

5.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

5.3.1 Critérios de Inclusão

Incluíram-se pacientes que estavam no intervalo de 9 meses a 12 anos de idade, que apresentavam efusão na orelha média por seis semanas ou mais, com diagnóstico de OMR (três ou mais episódios de OMA em seis meses) ou OMEC (persistência da efusão por mais de três meses) e que apresentavam indicação de miringotomia e colocação de tubo de ventilação. Os critérios diagnósticos para OME incluíram alterações da translucidez, variação na cor, retração, diminuição da mobilidade e aumento da vascularização radial da membrana timpânica. Todos os casos selecionados deveriam ter sido acompanhados clinicamente pelo investigador por um período mínimo de seis semanas antes da cirurgia.

A imitanciometria foi realizada, quando necessária, para confirmação da presença de efusão nos casos de OMR, e todos os pacientes com diagnóstico de OMEC foram avaliados com audiometria e imitanciometria.

A otoscopia pneumática sob visão vídeo-endoscópica foi efetuada em todos os pacientes, 24 horas antes do procedimento cirúrgico, para confirmar a ausência de sinais de infecção aguda.

5.3.2 Critérios de Exclusão

Excluíram-se pacientes que, no momento da cirurgia, apresentavam:

- OMA;
- outras infecções das vias aéreas superiores;
- otorréia;
- tratamento antibioticoterápico vigente ou concluído há menos de sete dias.

5.4 Logística

5.4.1 Inclusão dos Pacientes no Estudo

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão tiveram seus dados clínicos coletados e anotados em documento especificamente criado para o estudo, tendo os

pais ou responsável assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após exposição dos motivos para a realização da pesquisa (Anexos 1 e 2).

5.4.2 Coleta e Transporte do Material

O ato cirúrgico foi de natureza ambulatorial, e realizado, sob anestesia geral e auxílio de microscopia, pelo próprio investigador, no centro cirúrgico do Hospital Moinhos de Vento, em Porto Alegre.

A secreção analisada foi coletada da orelha média, como segue:

- Limpeza e remoção do cerúmen do meato acústico externo (MAE).
 - Antissepsia do MAE com álcool a 70% durante um minuto e posterior aspiração do mesmo.
 - Timpanocentese no quadrante antero-inferior da membrana timpânica e aspiração da efusão com agulha calibre 18, conectada ao instrumento de sucção e coleta Alden-Senturia (*Alden-Senturia collector*[®], Storz Instruments, St. Louis, USA). Empregou-se um segundo conjunto de coletor e agulha nos casos em que as duas orelhas de um mesmo paciente foram puncionadas (Figura 1).
 - Envio do material obtido para o Setor de Microbiologia e Biologia Molecular do Laboratório Weinmann, localizado no mesmo Hospital, para realização de exame cultural e análise pela PCR, no prazo máximo de quinze minutos após a coleta.
-

A proximidade entre o Centro Cirúrgico do Hospital e o Laboratório, aliada à rapidez com que as amostras chegavam ao Setor de Microbiologia e Biologia Molecular tornou desnecessária a utilização de meio de transporte, assim como a adoção de sistemas de manutenção de temperatura constante.



Figura 1 – Instrumento de aspiração e coleta de Alden- Senturia.

5.4.3 Análise das Amostras de Efusão

No laboratório, cada amostra de efusão foi dividida em duas alíquotas, uma das quais serviu para a análise bacterioscópica e cultural, enquanto a outra foi destinada à análise pela PCR. O estudo bacterioscópico e cultural teve seu início imediatamente após esta divisão. A alíquota destinada à análise por PCR foi congelada a -20°C para testagem posterior.

As análises culturais e com a PCR eram efetivadas por microbiologistas distintos, sem que um tivesse conhecimento dos resultados que estavam sendo obtidos pelo outro.

A análise cultural foi realizada com meios de cultura que permitissem o isolamento das três bactérias mais prevalentes nas otites médias, a saber: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, acrescidas do *Alloiococcus otitidis*. O mesmo critério foi empregado para a análise por PCR, que utilizou iniciadores (*primers*) específicos para cada um dos microrganismos acima citados.

5.4.3.1 Exame cultural

A análise iniciava imediatamente após a divisão da amostra em alíquotas, como citado acima. O exame bacterioscópico direto foi efetuado pela coloração de Gram.

Para a cultura, o material foi semeado em placas contendo o meio de ágar sangue de carneiro (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) e ágar chocolate (biolab-

Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) e incubado, em aerobiose, durante 24 horas, a 37°C. Não havendo crescimento bacteriano neste período de tempo, as placas foram reincubadas por mais 96 horas antes de serem liberadas com resultados definitivamente negativos.

A identificação bacteriana foi realizada por automação (Vitek[®], bioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, França), por meio da inoculação do microrganismo em painéis próprios para germes Gram-positivos ou Gram-negativos.

A resistência à penicilina pelo *S. pneumoniae* foi determinada pela obtenção de concentrações inibitórias mínimas (CIM), empregando-se a técnica do E-teste (*E test*[®], AB BIODISK, Sohna, Suécia), e classificando-se como: CIM ≤ 0,06 µg/ml = germe sensível, CIM entre 0,12 – 1,0 µg/ml = germe com resistência intermediária e CIM ≥ 2,0 µg/ml = germe com resistência plena, de acordo com critérios do NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2000).

O teste com Nitrocefina (OXOID Ltd., Basingstoke, Inglaterra), recomendado como teste alternativo pelo NCCLS, foi aplicado nas colônias de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* para a determinação da capacidade de produção de β-lactamase, classificando-as como capazes de produzir a enzima (β-lactamase +) ou não (β-lactamase -).

5.4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR utilizada nesta pesquisa é um método para detecção simultânea (*multiplex PCR*) de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *A. otitidis* e segue a

técnica descrita por HENDOLIN et al. (1997). 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.

Um iniciador ou *primer* comum, e quatro iniciadores ou *primers* específicos para cada uma das espécies foram empregados para gerar quatro produtos de PCR de diferentes tamanhos. As seqüências do gene 16S rRNA utilizadas nos iniciadores comuns e nos específicos foram as mesmas empregadas por HENDOLIN et al. (1997).

O iniciador comum é uma seqüência de 20 pares de bases localizada nas posições 676 a 696 do gene 16S rRNA no *A. otitidis*; nas posições 679 a 699 do gene 16S rRNA no *H. influenzae*; nas posições 630 a 650 do gene 16S rRNA na *M. catarrhalis*; e nas posições 567 a 587 do referido gene no *S. pneumoniae*.

Os iniciadores específicos foram os seguintes: para o *A. otitidis*, uma seqüência de bases localizada nas posições 437 a 456 do gene 16S rRNA da bactéria; para o *H. influenzae*, uma seqüência de bases localizada nas posições 177 a 200; para a *M. catarrhalis*, uma seqüência localizada nas posições 416 a 435; e para o *S. pneumoniae*, uma seqüência localizada nas posições 106 a 127 do gene.

A preparação dos reagentes foi realizada numa capela de fluxo laminar B2, equipada com filtros HEPA e luz UV, para impedir a entrada de microrganismos e para inativar moléculas de DNA que pudessem entrar na capela. Uma segunda área foi destinada exclusivamente à extração do DNA, sempre com o emprego de avental e luvas. Uma terceira área, utilizada para a amplificação e detecção do produto da PCR, não tinha contato direto com as anteriores e também exigia o uso de luvas e aventais exclusivos desta área, de

forma a impedir que o DNA amplificado entrasse em contato com amostras que estivessem chegando ao laboratório ou que estivessem em processo de extração do DNA.

A especificidade foi verificada com cepas padrões de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, sendo os resultados adequados. Como não havia cepa padrão do *A. otitidis*, o produto da amplificação gerado foi submetido ao seqüenciamento direto, e a seqüência gerada foi comparada com seqüências de DNA do germe depositadas no *GenBank*[®], do National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2001). Exigiu-se 100% de homologia entre essas seqüências para comprovar que se tratava realmente do *A. otitidis*.

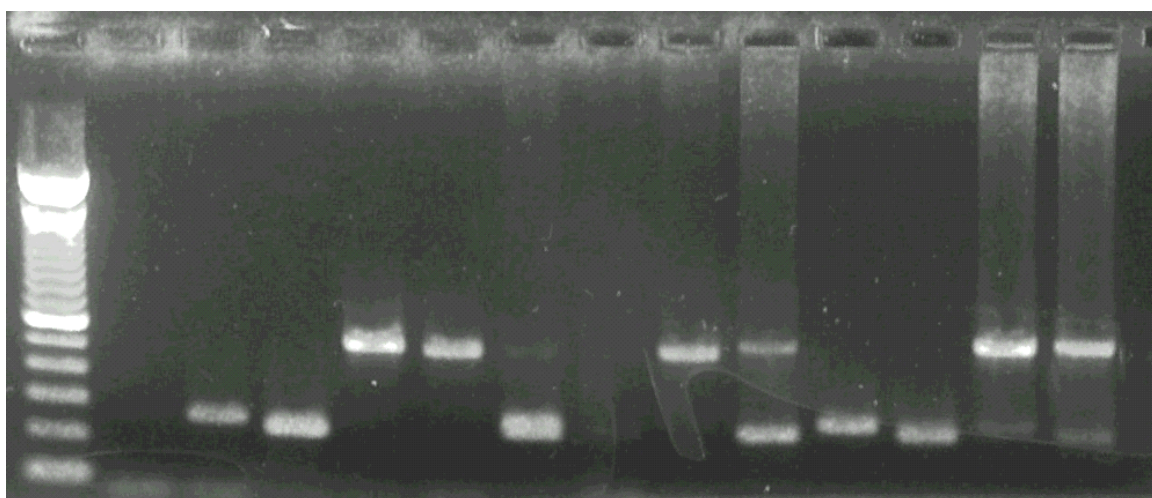
A amostra de efusão previamente congelada passava por um processo de descongelamento e era transferida para um tubo de Eppendorf estéril. O DNA era extraído utilizando-se o *kit* comercialmente disponível QIAamp[®] (Qiagen, Valencia, EUA) e era posteriormente eluído em 200 µl de uma solução-tampão, conforme instruções do fabricante. O material obtido era então armazenado a -20°C e assim permanecia até o momento da realização da PCR.

As soluções da PCR simultânea continham 1,6 µM do iniciador para o *A. otitidis*; 1,4 µM do iniciador para o *H. influenzae*; 0,2 µM do iniciador para a *M. catarrhalis*; 0,04 µM do iniciador para o *S. pneumoniae*; e 0,2 µM do iniciador comum. Para cada reação, adicionou-se 1,25 U de polimerase *Taq* (GeneAmp[®], Applied Biosystems, Branchburg, EUA) em tampão apropriado, conforme instruções contidas no *kit*. Utilizou-se 5 µl da solução de DNA extraída das amostras, num volume final de reação de 50 µl. O perfil da reação era de três minutos de desnaturação inicial a 94°C, 38 ciclos de

94°C por 30 segundos, 66°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, seguido de uma extensão final de 72°C durante cinco minutos. Os produtos amplificados eram então separados em gel de agarose a 3% e visualizados com luz ultravioleta. (Figura 2)

O resultado era reportado como positivo ou negativo para cada uma das bactérias, seguindo o proposto por HENDOLIN et al. (1997, 2000).

MP 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



MP. Marcador de peso molecular	6. Paciente 61	OD = <i>M. catarrhalis</i>	OD: orelha direita
1. Controle negativo	7. Paciente 62	OD = negativo	OE: orelha esquerda
2. <i>A. otitidis</i>	8. Paciente 62	OE = <i>S. pneumoniae</i>	
3. <i>M. catarrhalis</i>	9. Paciente 63	OE = <i>H. influenzae</i> ; <i>M. catarrhalis</i>	
4. <i>H. influenzae</i>	10. Paciente 64	OD = <i>A. otitidis</i>	
5. <i>S. pneumoniae</i>	11. Paciente 64	OE = <i>M. catarrhalis</i>	
	12. Paciente 44	OD = <i>H. influenzae</i>	
	13. Paciente 44	OE = <i>H. influenzae</i>	

Figura 2 – Visualização dos produtos de amplificação pela PCR, sob luz ultravioleta.

5.5 Cálculo do Tamanho da Amostra

Partindo-se de uma prevalência esperada de positividade bacteriana na PCR de 75%, e de 25% para o exame cultural, com uma margem de erro de 10%, estimou-se um tamanho de amostra de pelo menos 72 efusões. Considerando-se os objetivos específicos do estudo, que envolviam comparações das distribuições de frequência das positivities bacterianas entre OMR e OMEC e entre grupos etários acima e abaixo de dois anos, optou-se por aumentar o tamanho da amostra para 120 efusões. Este tamanho de amostra permitiu a comparação de diferenças de pelo menos 20% entre grupos, fixando-se $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$.

5.6 Análise Estatística

Os dados relativos à frequência dos achados positivos e negativos, tanto para o exame cultural quanto para a PCR, foram descritos por frequência absoluta e percentuais.

A comparação entre os achados do exame cultural e da PCR foi realizada por meio da utilização de uma tabela de contingência estratificada por tipo bacteriano, apresentando frequências e percentuais.

O impacto da contribuição da PCR sobre os resultados do exame cultural foi avaliado por meio do delta percentual ($\Delta\%$), definido como:

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

A avaliação de associações entre subgrupos identificados no estudo foi realizada pelo teste qui-quadrado (χ^2) de McNemar, no caso de observações emparelhadas. Nas situações de observações independentes, utilizou-se o teste do χ^2 com correção de Yates, e o teste exato de Fisher, quando necessário (KIRKWOOD, 1988).

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados da pesquisa foram armazenados em um banco de dados programado para esse fim, utilizando-se o programa Microsoft Excel[®], versão 2002, para Windows[®] XP (Anexo 3). O pacote estatístico empregado foi o Statistical Package for Social Sciences (SPSS[®]), versão 11.0 e o EPI-INFO, versão 6 (SPSS FOR WINDOWS, 2001; DEAN et al., 1996).

5.7 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do processo de número 02-311.

O consentimento foi obtido dos pais ou responsável, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para utilização anônima dos dados (Anexo 1).

A indicação da necessidade de realização do procedimento cirúrgico foi exclusivamente médica e antecedeu a admissão do paciente no estudo, sendo, inclusive, condição para inclusão na amostra. A aspiração da efusão da orelha média é parte compulsória da cirurgia, e é desprezada quando não enviada para exames complementares.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Resultados Gerais e Caracterização dos Pacientes

Num período de dezessete meses, analisaram-se 128 efusões de orelha média obtidas de 75 pacientes pediátricos submetidos à miringotomia e à colocação de tubo de ventilação. A idade das crianças variou de 11 meses a 9 anos e 4 meses, com uma média (\pm desvio padrão) de $34,7 \pm 18,5$ meses. No que se refere à distribuição por gênero, 45 (60%) delas eram meninos e 30 (40%) meninas. Todos os pacientes eram da raça branca.

Um total de 53 (70,7%) dos 75 pacientes forneceram secreção de ambas as orelhas e em 29 (54,7%) desses 53 encontraram-se bactérias diferentes em cada orelha, quando da análise pela PCR.

Cinquenta e dois (69,3%) pacientes apresentavam OMR e 23 (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. A distribuição por tipo de efusão está apresentada na Figura 3.

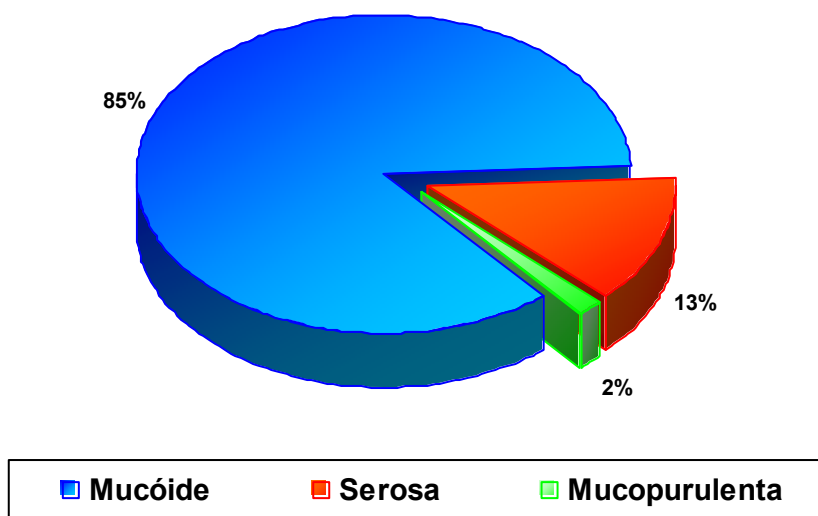


Figura 3 – Tipos de efusões que forneceram amostras para o estudo.

A Figura 4 mostra a distribuição dos pacientes de acordo com o tipo de cirurgia realizado.

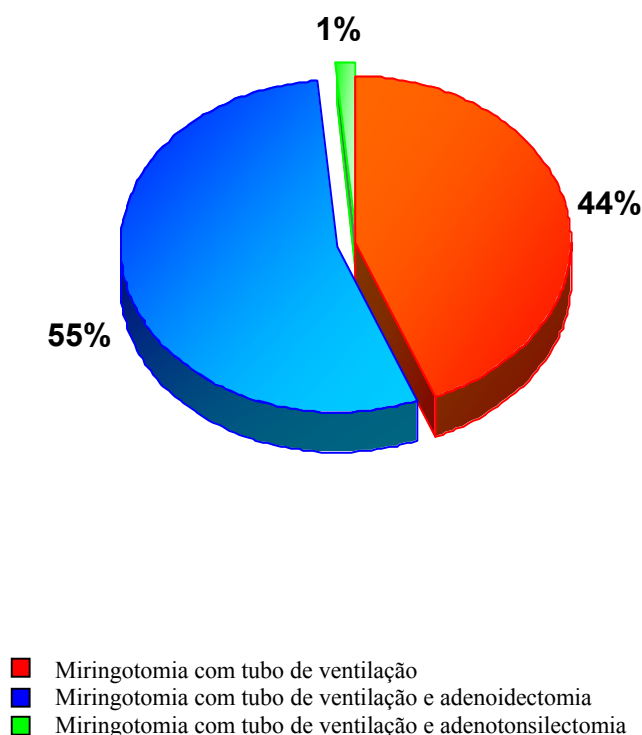


Figura 4 – Tipos de cirurgia realizados para a obtenção das 128 efusões.

A história familiar de otite média estava presente em 34 (45,3%) dos pacientes incluídos no estudo, e 15 crianças (20%) tinham um ou ambos os pais fumantes. Um total de 41 (54,7%) pacientes foram amamentados ao seio por ≥ 6 meses, 32 (42,7%) por < 6 meses e dois (2,6%) não foram amamentados. A frequência à creche foi registrada em 67 (89,3%) das 75 crianças com otite média (Figura 5).

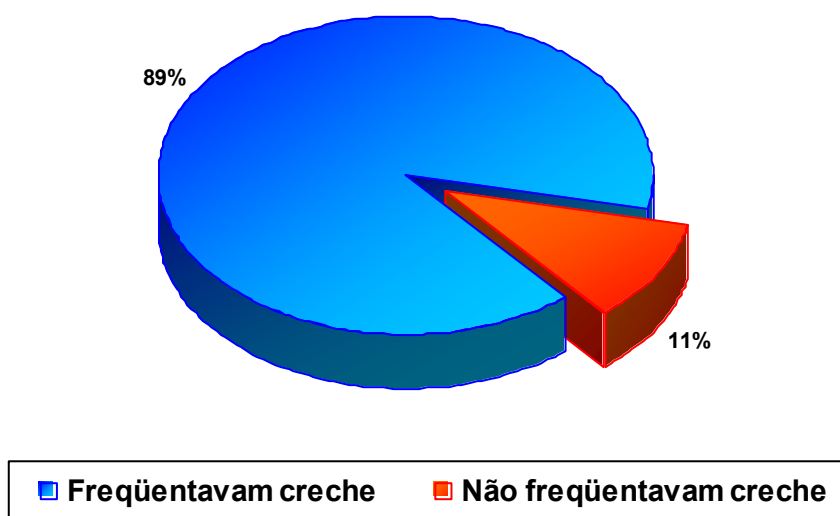


Figura 5 – Frequência à creche dos pacientes incluídos no estudo.

O primeiro episódio de otite média aguda dos pacientes incluídos na pesquisa ocorreu em média com $12,9 \pm 9,2$ meses. Todas as crianças com OMEC apresentaram uma curva B de Jerger na imitanciometria. Destas, 22 demonstraram um *gap* médio de $30 \pm 7,2$ dB na audiometria tonal e uma foi submetida ao exame de potencial evocado auditivo de tronco cerebral, apresentando limiares auditivos em 90 dB.

6.2 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%). O *A. otitidis* não foi detectado por meio da cultura. Outras bactérias, usualmente consideradas de pouca importância clínica ou não-patogênicas na orelha média, foram

encontradas em sete (5,5%) efusões. A tabela 1 apresenta os dados de frequência individuais das bactérias citadas.

Tabela 1 – Exame cultural de amostras das 128 efusões de orelha média

Resultado/espécie	<i>f</i>	%
<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).

6.3 Exame PCR

Encontraram-se DNA de uma ou mais das quatro bactérias estudadas em 110 (85,9%) das 128 amostras de efusões. A Figura 6 ilustra a frequência com que os microrganismos foram identificados, isolados ou em associação.

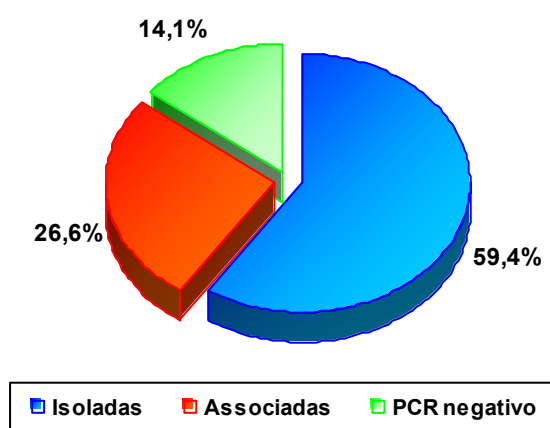


Figura 6 – Frequência de identificação das bactérias, de forma isolada ou em associação, na análise por PCR de 128 amostras de efusões.

Em 76 amostras de EOM, houve identificação de um único germe por efusão. Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 2.

Em 34 efusões positivas, encontraram-se misturas de DNA bacteriano. O *A. otitidis* foi identificado em associação com outras bactérias em 30 (88%) dessas efusões. Já o *H. influenzae* foi identificado em 26 (77%) das 34 EOM junto com outras bactérias. A Tabela 2 mostra os resultados dessas associações.

Tabela 2 – PCR em amostras de 128 efusões de orelha média

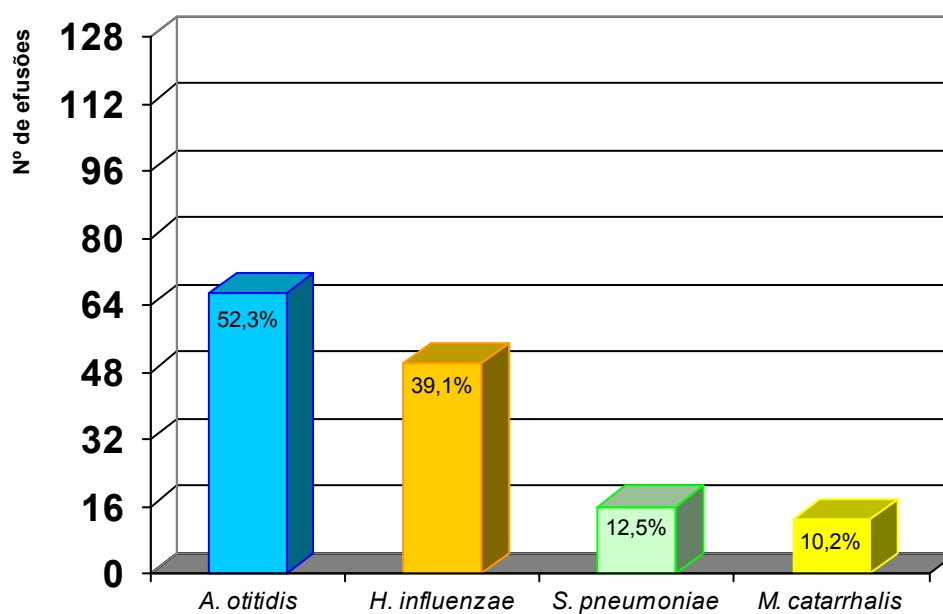
Resultado/espécie	<i>f</i>	%
<i>A. otitidis</i>	37	28,9
<i>H. influenzae</i>	24	18,8
<i>S. pneumoniae</i>	8	6,3
<i>M. catarrhalis</i>	7	5,5
<i>A. otitidis</i> + <i>H. influenzae</i>	20	15,7
<i>A. otitidis</i> + <i>S. pneumoniae</i>	6	4,7
<i>A. otitidis</i> + <i>M. catarrhalis</i>	2	1,6
<i>A. otitidis</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

Juntando-se os dados de identificação isolada com os de associação de bactérias, 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. A Figura 7 ilustra esta prevalência.



Os percentuais individuais somam mais de 100% em virtude da ocorrência de associações bacterianas em uma mesma amostra de efusão.

Figura 7 – Prevalência das quatro bactérias estudadas nas 128 amostras de efusões de orelha média, quando analisadas pela reação em cadeia da polimerase.

6.4 Comparação Entre os Dados do Exame Cultural e da PCR

A tabela 3 apresenta o cruzamento dos resultados obtidos pelo exame cultural e pela PCR, salientando o impacto da contribuição da PCR sobre o aumento da positividade do exame cultural ($\Delta\%$).

Tabela 3 – 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.

6.4.1 Análise para o *Alloiococcus otitidis*

Das 128 amostras de EOM que foram negativas na cultura, 67 (52,3%) encontraram DNA dessa bactéria pela PCR, isoladamente ou em associação com DNA de um ou mais dos outros germes estudados (Tabela 3).

6.4.2 Análise para o *Haemophilus influenzae*

Todas as efusões em que a cultura foi positiva produziram um resultado também positivo pela PCR. Um total de 13 (10,1%) das 128 amostras estudadas foi simultaneamente positivo para esta bactéria através da cultura e da PCR. Das 115 amostras de EOM que foram negativas na cultura, 37 (32,2%) foram positivas para esta bactéria pela PCR. Dessa maneira, somando-se as informações da cultura e do PCR, encontrou-se *H. influenzae* num total de 50 (39,1%) efusões, o que proporcionou um aumento de 285% na positividade inicialmente indicada pelo exame cultural (Tabela 3).

6.4.3 Análise para o *Streptococcus pneumoniae*

Identificou-se a bactéria pela PCR em todas as efusões em que se isolou o germe pelo exame cultural. Oito (6,3 %) das 128 efusões analisadas apresentaram cultura e PCR simultaneamente positivos para o germe. De 120 EOM negativas na cultura, 8 (6,7%)

deram origem a um resultado positivo pela PCR. Assim sendo, ao adicionarmos os dados de PCR aos do exame cultural, temos que o *S. pneumoniae* foi identificado num total de 16 (12,5%) das 128 efusões estudadas (Tabela 3).

6.4.4 Análise para a Moraxella catarrhalis:

Todas as efusões em que a cultura foi positiva também produziram resultado positivo pela PCR. Cinco (3,9%) das 128 efusões foram simultaneamente positivas pela cultura e pela PCR. Das 123 efusões negativas na cultura, 8 (6,5 %) resultaram positivas pela PCR. Portanto, o total de efusões positivas para a *M. catarrhalis*, juntando-se os dados de cultura e PCR, foi 13 (10,2%). Estes dados estão apresentados na Tabela 3.

6.4.5 Análise Conjunta

Um total de 25 (19,6%) das 128 efusões apresentou um exame cultural positivo para uma ou mais das bactérias estudadas. Em comparação, 110 (85,9%) das 128 amostras de EOM foram positivas para um ou mais dos patógenos avaliados pela PCR. Nenhuma das efusões com PCR negativo foi detectada como positiva pelo exame cultural. Do total de 103 amostras de efusões com culturas negativas para as bactérias estudadas, 85 (82,5%) foram positivas pela PCR (Tabelas 3 e 4).

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, $P < 0,01$). A Tabela 4 apresenta os dados comparativos.

Tabela 4 – 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

O aumento observado na proporção de efusões com testes positivos no exame cultural, provocado pela PCR, foi: *A. otitidis* - indeterminado, pois este não foi isolado em cultura; *H. influenzae* - 285%; *S. pneumoniae* - 100%; *M. catarrhalis* - 160%. 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* (Tabela 3).

6.5 Frequência das Bactérias Encontradas em OMR e OMEC

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 ($P=0,136$). A análise dos dados mostra que o *A. otitidis* e o *H. influenzae* apresentaram distribuições semelhantes nos dois grupos. O mesmo não pode ser dito para o *S. pneumoniae* e a *M. catarrhalis*, uma vez que o *S. pneumoniae* foi 7,2 vezes mais freqüente na OMR do que na OMEC, atingindo significância estatística, e a *M. catarrhalis* também foi mais freqüente na OMR, sem, no entanto, alcançar significância estatística. Os dados obtidos com a PCR estão apresentados na Tabela 5.

Os dados obtidos com o exame cultural mostraram distribuição diferente entre os grupos de OMR e OMEC somente para o *S. pneumoniae*, situação em que se obteve uma significância limítrofe ($P=0,054$). Os resultados da cultura aparecem na Tabela 6.

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 – Frequência das bactérias em 128 efusões de OMR e OMEC na análise pelo exame cultural

Cultura (+)	Indicação Cirúrgica		Total	P*
	OMR n = 87	OMEC n = 41		
<i>A. otitidis</i>	0	0	0	-
<i>H. influenzae</i>	9 (10,3%)	4 (9,7%)	13	0,999
<i>S. pneumoniae</i>	8 (9,2%)	0	8	0,054
<i>M. catarrhalis</i>	4 (4,6%)	1(2,4%)	5	0,999

Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

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

n : número de efusões

* teste exato de Fisher

6.6 Comparação dos Resultados Obtidos pela PCR em Efusões de Crianças Menores e Maiores de Dois Anos

A comparação dos resultados obtidos pela PCR em efusões de crianças de dois grupos etários diferentes, menores e maiores de dois anos de idade, mostrou frequência semelhante de todas as bactérias nos dois grupos, excetuando-se o *H. influenzae*, que foi encontrado em 52,4% das efusões de crianças menores de dois anos, e em 32,6% das efusões de crianças maiores. Isso produziu uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,049$). A comparação dos resultados completos encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação dos resultados da PCR em 128 efusões de crianças menores e maiores de dois anos

PCR (+)	Idade		Total	P
	< 2 anos <i>n</i> = 42	≥ 2 anos <i>n</i> = 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.

6.7 Perfil de Resistência das Bactérias Isoladas pelo Exame Cultural

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. O *S. pneumoniae* foi classificado como sensível, com resistência intermediária ou resistente à penicilina, de acordo com a CIM determinada pelo E-teste, e o *H. influenzae* e a *M. catarrhalis* como capazes ou não de produzir β -lactamase. O *A. otitidis* não foi encontrado em cultura, e os outros microrganismos identificados (*Streptococcus oralis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Brevibacterium* sp e *Corinebacterium auris*) não foram testados.

Os resultados estão apresentados na Tabela 8. Se consideramos a capacidade de produzir β -lactamase como sinônimo de resistência à penicilina e a outros agentes β -lactâmicos, vemos na Figura 8 que o *S. pneumoniae* foi considerado com resistência intermediária em três (37,5%) culturas e plenamente resistente em duas (25,0%) das oito vezes em que foi identificado. Já o *H. influenzae*, isolado em 13 oportunidades, mostrou-se resistente à penicilina em três (23,0%) delas e a *M. catarrhalis* mostrou-se resistente em 100% das vezes em que foi isolada (5/5).

Quanto à distribuição por grupos, 10 (11,5%) das 87 EOM de OMR e duas (4,9%) das 41 EOM de OMEC apresentaram bactérias resistentes à penicilina. Na análise por grupo etário, sete (16,7%) das 42 EOM de crianças menores de dois anos, e cinco (5,8%) das 86 EOM de crianças maiores também possuíam isolados bacterianos resistentes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados mencionados.

Tabela 8 – Perfil de resistência à penicilina (*) em 26 isolados bacterianos de amostras de efusão de otite média com efusão

Cultura (+)	Sensível f (%)	Intermediária f (%)	Resistente 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)

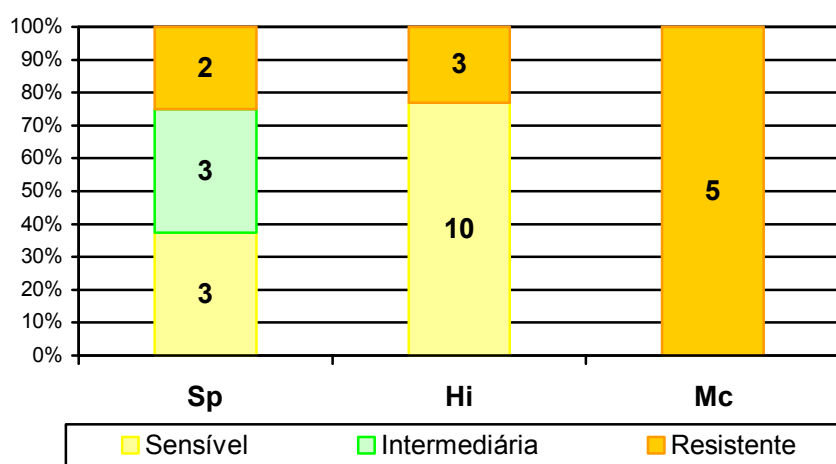
Os dados são apresentados como números absolutos e percentuais.

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

Produção de β -lactamase pelo *H. influenzae* e *M. catarrhalis*: (-) = sensível (+) = resistente

f: frequência

n: número de isolados bacterianos

**Figura 8** – Representação gráfica do perfil de resistência à penicilina das bactérias estudadas.

Sp: *S. pneumoniae* Hi: *H. influenzae* Mc: *M. catarrhalis*

Os números dentro das barras representam isolados bacterianos.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado visando a aperfeiçoar e aumentar nosso conhecimento sobre a bacteriologia da otite média com efusão.

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. Desde então, estudos foram desenvolvidos em várias regiões do mundo, com o objetivo de identificar e caracterizar a bacteriologia da OME, aperfeiçoando o entendimento acerca do seu papel na patogênese da doença.

Apenas 20 – 40% das EOM obtidas de crianças com OME fornecem resultado positivo para alguma bactéria, quando da realização de exames culturais (GIEBINK et al., 1982; KRENKE et al., 1988; GIEBINK, 1989b; BLUESTONE et al., 1992). Mais recentemente, vários estudos que empregaram a PCR revelaram a presença de DNA bacteriano numa quantidade significativa de efusões negativas através da cultura, reforçando a hipótese da etiologia bacteriana da OME (HOTOMI et al., 1993; POST et al.,

1995; UEYAMA et al., 1995; JERO et al., 1996; HENDOLIN et al., 1997; MATAR et al., 1998; RAYNER et al., 1998; LIEDERMAN et al., 1998; HENDOLIN et al., 2000; GOK et al., 2001; LESKINEN et al., 2002).

O objetivo geral do presente estudo foi determinar a prevalência de três bactérias comuns do trato respiratório superior, acrescidas do *A. otitidis*, na efusão da orelha média de crianças que apresentavam OME, por meio do exame cultural e da PCR. A inclusão do *A. otitidis* deveu-se ao fato de que sua localização intracelular, sua identificação em cultura pura e sua presença associada com um número significativo de células inflamatórias nas EOM sugerem fortemente um papel patogênico para o mesmo.

Dois características dos estudos pertinentes ao tema impõem, a nosso ver, algum obstáculo para a correta valorização de suas informações e para a comparação com os dados gerados pela presente pesquisa. Estas são (a) a não-uniformidade da definição de OME e do tempo de existência da EOM; e (b) a inexistência de critérios relacionados ao uso de antibióticos por parte dos pacientes que forneciam as efusões. 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 esteve presente e sobre a eventual utilização concomitante de antibióticos.

A AHCPR (*Agency for Health Care Policy and Research*) norte-americana definiu a permanência mínima de seis semanas da efusão na orelha média, sem sintomatologia aguda, como condição para que a patologia fosse denominada OME e este foi o parâmetro por nós utilizado (STOOL et al., 1994). De outro lado, as crianças incluídas em nosso estudo não poderiam estar sob tratamento antibacteriano desde uma semana antes da coleta do material, e tiveram a indicação de miringotomia com colocação de tubo de ventilação por apresentarem OME. A permanência da secreção na orelha média deveria ser documentada por um mínimo de seis semanas para aquelas que tinham o diagnóstico de OMR e por um mínimo de três meses para as que desenvolveram OMEC. Alguns estudos empregaram exatamente os mesmos parâmetros por nós adotados (RIDING et al., 1978; QVARNBERG et al., 1990; HADDAD JR. et al., 2000; SIH, 2002), outros envolveram pacientes com menos tempo de persistência da EOM e alguns somente indivíduos com OMEC. O uso concomitante de antibióticos foi tolerado por alguns autores, prazos diferentes desde o último tratamento foram relatados e, em outras ocasiões, a informação não se fez presente.

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

7.1 Características Gerais dos Pacientes

A análise das características mais importantes da amostra estudada e seu cotejamento com dados já publicados, mesmo não sendo objetivo primordial da pesquisa, pode facilitar e valorizar a comparação dos achados principais com aqueles obtidos em outros estudos.

A idade média das crianças que forneceram amostras de efusão da orelha média ($34,7 \pm 18,5$ meses) condiz com dados de SIH (2002), que relatou uma idade média de 34,5 meses, e não difere muito das idades médias de 29,0 meses referidas por LESKINEN et al. (2002). Já SUTTON et al. (2000) e BROOK et al. (2001) obtiveram médias de 40,7 e 42 meses, respectivamente, para a realização de miringotomia e colocação de tubo de ventilação, números que se colocam dentro da faixa coberta pelo amplo desvio-padrão encontrado.

Os pacientes incluídos nesta pesquisa eram todos da raça branca. CASSELBRANT et al. (1995) mostraram que crianças afro-americanas e brancas, acompanhadas mensalmente até dois anos de idade, apresentavam taxas semelhantes de OMA e de OME. PARADISE et al. (1997) e HOFFMAN et al. (1999) referiram as mesmas conclusões ao analisarem especificamente crianças com OME. Somente esquimós da Groenlândia e do Canadá e aborígenes australianos demonstram uma incidência de OMA e OME documentadamente maior do que a registrada em outras populações (BOSWELL e NIENHUYS, 1995; HOMOE et al., 1996; KRAMER e McCULLOUGH, 1998). Entende-se, portanto, que a inexistência de representantes de outras raças prevalentes em nosso país,

no grupo de crianças que forneceu amostras de EOM, não limita a interpretação dos dados de maneira significativa.

Sessenta por cento dos pacientes desta pesquisa eram meninos. PUKANDER et al. (1982) e TEELE et al. (1989) mostraram que crianças do sexo masculino apresentavam risco maior de desenvolverem otite média, e não encontramos estudo que mostrasse incidência maior de doença da orelha média em meninas. Trabalhos recentes confirmaram que o gênero masculino é fator de risco significativo para OMR, OME, OMEC e para tratamento com tubo de ventilação (ÁLHO et al., 1995 e 1996; PARADISE et al., 1997; JERO e KARMA, 1997; SASSEN et al., 1997; APOSTOLOPOULOS et al., 1998; MAC TURK et al., 1999; ENGEL et al., 1999). A diferença na proporção de meninos e meninas em nossa pesquisa não é estatisticamente significativa, mas o número maior de meninos está de acordo com a literatura citada.

A idade média em que ocorreu o primeiro episódio de OMA nos pacientes do presente estudo foi de 12,9±9,2 meses. Segundo PUKANDER et al. (1984), SIPILÄ et al. (1987), TEELE et al. (1989) e CASSELBRANT (1995), a maior incidência de OMA ocorre entre 6-12 meses de idade. TEELE et al. (1989) também afirmam que a ocorrência deste primeiro episódio antes de seis meses é um fator preditivo de recorrência da OMA. Outros estudos (ÁLHO et al., 1996; JERO e KARMA, 1997b; SASSEN et al., 1997; PARADISE et al., 1997; APOSTOLOPOULOS et al., 1998; MAC TURK et al., 1999; ENGEL et al., 1999) confirmaram que a pouca idade e a idade em que ocorre o primeiro episódio são fatores de risco significativos para OMR, OMEC e para tratamento com tubo de ventilação. Isso quer dizer que, quanto mais baixa a idade em que acontece o primeiro episódio de OMA, e quanto mais baixa a idade em que outros episódios são diagnosticados, maior o

risco de evolução para otite média recorrente, otite média com efusão e maior a necessidade de intervenção cirúrgica. A idade média das crianças com indicação de colocação de tubo de ventilação arroladas nesta pesquisa ($34,7 \pm 18,5$ meses) corrobora a ocorrência de episódios anteriores de otite média com pouca idade, e a idade média do primeiro episódio de OMA está de acordo com as observações encontradas na literatura.

A história familiar de otite média esteve presente em quase metade (45,3%) dos pacientes incluídos em nossa pesquisa. KVAERNER et al. (1997b) demonstraram que a hereditariedade foi significativa para 74% das meninas e 45% dos meninos que desenvolviam otite média. CASSELBRANT et al. (1999), num estudo prospectivo, confirmaram uma história familiar positiva nos sujeitos do estudo, sem distinção de gênero. Dessa forma, a frequência com que uma história familiar positiva para otite média foi encontrada no grupo de crianças de quem coletamos as efusões não é significativamente diferente daquela referida na literatura.

Quanto ao fumo, 15 (20%) dos pequenos pacientes tinham um ou ambos os pais fumantes. Estudos sobre a relação da exposição ao fumo com otite média dividem-se entre os que apontam uma relação dose-resposta (COLLET et al., 1995; EY et al., 1995; PARADISE et al., 1997; APOSTOLOPOULOS et al., 1998) e os que não confirmam esta relação (ÁLHO et al., 1995; STENSTROM e INGVARSSON, 1997b; SASSEN et al., 1997; KVAERNER et al., 1997a; ROVERS et al., 1998; MAC TURK et al., 1999; YANG et al., 1999). Infelizmente, estes estudos apresentam delineamentos diferentes e podem não ter poder estatístico para demonstrar relações significantes. De qualquer maneira, os dados obtidos por nós não permitem conclusões relevantes a este respeito.

A história de amamentação ao seio materno estava presente na quase totalidade das crianças incluídas no estudo (72/75 pacientes). Quarenta e uma delas (54,7%) foram amamentadas ao seio por mais de seis meses. Inúmeros estudos sugerem um efeito benéfico do aleitamento materno sobre a diminuição da incidência de otite média nos primeiros meses de vida (DUNCAN et al., 1993; ANIANSSON et al., 1994; UHARI et al., 1996; DUFFY et al., 1997; FADEN et al., 1997; KLEIN et al., 1998). Por outro lado, ÁLHO et al. (1995), STENSTROM e INGVARSSON (1997a), SASSEN et al. (1997), KVAERNER et al. (1997a), ROVERS et al. (1998), MAC TURK et al. (1999) e YANG et al. (1999) não concordam com tal afirmação. A presente pesquisa não foi desenhada para avaliar o papel da amamentação ao seio sobre a incidência de infecções da orelha média e, dessa maneira, os dados obtidos apenas sugerem uma postura favorável à amamentação por parte da população estudada.

Sessenta e sete (89,3%) das 75 crianças de quem coletamos efusão de orelha média freqüentavam creches. A maioria dos estudos que avaliou a relação entre freqüência à creche e otite média relatou que a exposição a outras crianças aumentou o risco de OMA, OMR e OME (KVAERNER et al., 1996a; ÁLHO et al., 1996; PARADISE et al., 1997; ENGEL et al., 1999; NAFSTAD et al., 1999; DALY et al., 1999a). Crianças que eram cuidadas em creches tinham um risco significativamente maior de colocação de tubo de ventilação quando comparadas com um grupo controle (POSTMA et al., 1997). A freqüência à creche das crianças arroladas em nossa pesquisa está de acordo com a literatura que, aponta esta freqüência como um fator de risco, tanto para IVAS quanto para OM. Contudo, não se pode deixar de notar que o delineamento por nós utilizado não é adequado para estudar tal relação, já que não avaliamos a freqüência a creches ou maternais

de pacientes sem otite média. Assim como ocorreu com a amamentação ao seio, o elevado comparecimento à creche observado entre os pacientes deste estudo, pode apenas refletir uma característica comportamental da sociedade de onde provêm.

7.2 Prevalência das Bactérias nas Efusões

7.2.1 Exame Cultural

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. O percentual geral de crescimento bacteriano (25,1%) e de identificação das principais bactérias apontadas como patogênicas (19,6%) no exame cultural estão de acordo com essa literatura, que refere isolamento bacteriano em 20 a 40% das efusões existentes neste tipo de otite, quando submetidas às técnicas microbiológicas convencionais. 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 (BLUESTONE et al., 1992). 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. (2000) 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 outros, obtidos em estudos feitos em nosso país mostra discrepâncias. SAFFER et al. (1996) não encontraram bactérias nas 94 efusões de OME (25% delas com duração entre seis semanas e três meses, e o restante enquadrando-se na definição mais atual de OMEC), exceto por um único isolamento de *Staphylococcus epidermidis*. FILIZZOLA et al. (1998) analisaram 51 efusões de OMEC, obtendo um percentual de positividade bacteriana (23,5%) muito semelhante ao encontrado na presente pesquisa. Por outro lado, a análise individual mostra que o *S. aureus* predominou, seguido do *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *H. influenzae*, não tendo sido isolada *M. catarrhalis*. Por último, REZENDE et al. (1999), estudando efusões de 30 crianças com OMEC, encontraram bactérias em 33,4% dos casos, aí predominando o *S. pneumoniae*, seguido do *H. influenzae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis* e *S. epidermidis*. 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. É importante citar que o BHI, meio de cultura tido como o mais 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 DRYJA (1989) identificarem pioneiramente este microrganismo.

7.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR aumentou significativamente a frequência de identificação bacteriana nas EOM dos diversos tipos de otite média. Técnicas com diferentes métodos de extração do DNA e métodos de PCR simultâneo (*multiplex* PCR) ou individuais apresentaram resultados muito semelhantes.

Encontrou-se DNA de uma ou mais das quatro bactérias estudadas em 85,9% das amostras de EOM, estando de acordo com a literatura, na qual esse percentual variou entre 50 e 94,5% (HOTOMI et al., 1993; POST et al., 1995; JERO et al., 1996; HENDOLIN et al., 1997; MATAR et al., 1998; HENDOLIN et al., 1999; BESWICK et al., 1999; HENDOLIN et al., 2000; GOK et al., 2001; LESKINEN et al., 2002). 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. Esta também foi a opinião de HENDOLIN et al. (1999) e LESKINEN et al. (2002) quando compararam suas pesquisas com trabalhos até então publicados. 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.

7.3 Comparação Entre os Dados do Exame Cultural e da PCR

O exame cultural identificou uma ou mais das quatro bactérias estudadas em 19,6% das efusões, enquanto a PCR detectou DNA dessas mesmas bactérias em 85,9% das amostras. 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 e na PCR foi estatisticamente significativa para as bactérias incluídas na pesquisa, individual e coletivamente ($P < 0,01$). Resultados semelhantes e com igual significância estatística foram relatados por HOTOMI et al. (1993), POST et al. (1995), HENDOLIN et al. (1997), MATAR et al. (1998), BESWICK et al. (1999), GOK et al. (2001) e LESKINEN et al. (2002).

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. (1995), e de 260% relatado por HENDOLIN et al. (1997).

A PCR representa a técnica de identificação de ácido nucléico mais conhecida e bem sucedida até o momento, sendo capaz de detectar agentes infecciosos com rapidez, sensibilidade e especificidade maiores do que os métodos microbiológicos convencionais (NISSEN e SLOOTS, 2002). À medida que a etiologia infecciosa da OME foi tornando-se mais aceita e reconhecida, a hipótese de que alguns dos episódios dessa patologia pudessem ser causados por microrganismos não-cultiváveis foi aventada e estudada com mais frequência. Em função disso, a utilização de métodos baseados na identificação do DNA passou a merecer mais atenção por parte de muitos investigadores.

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 patogênicas viáveis, havendo a possibilidade de representarem apenas fragmentos de DNA residual ou “restos fossilizados” de bactérias, como referido por CANTEKIN (1996). Essa possibilidade serviu de justificativa para alguns trabalhos em animais, os quais 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 e na clínica otorrinolaringológica em geral. Usando o modelo de OM em chinchilas, POST et al. (1996a) 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. (1998), 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 pelo elegante estudo de RAYNER et al. (1998), no qual 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 efusões de orelha média 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 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/ml (STENFORS e RÄISÄNEN, 1990; MATAR et al., 1998); (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 cultivo (ATAOGLU et al., 1994; GÖKSU et al., 1996; GOK et al., 2001); (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 resistências aos antimicrobianos (COSTERTON et al., 1995; RAYNER et al., 1998; DINGMAN et al., 1998). 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.

Por fim, a detecção dos microrganismos associados às diferentes apresentações da otite média é difícil e pouco fidedigna quando empregados apenas métodos culturais. As razões para o não-crescimento de germes efetivamente presentes são, como se discutiu, complexas, e a microbiologia moderna raramente considera a ausência de colônias bacterianas como indicação de uma efusão verdadeiramente estéril. Por outro lado, se o emprego de técnicas de biologia molecular aumenta a identificação de germes tidos como atípicos e melhora a detecção daqueles já conhecidos por sua capacidade patogênica, estimula, paralelamente, o aperfeiçoamento do exame cultural, fazendo com que a combinação de técnicas de PCR e cultura venha a ser cada vez mais utilizada nos laboratórios clínicos.

7.4 Presença do *Alloiococcus otitidis* nas Efusões de Orelha Média

Ao que se pôde constatar, o presente estudo é o primeiro realizado no Brasil em que a prevalência do *A. otitidis* foi estudada especificamente. A identificação de DNA desta bactéria em 67 (52,3%) das 128 amostras de EOM tornou-a a mais encontrada nesta pesquisa, o que sugere que, também aqui, esse microrganismo pode estar relacionado à etiopatogênese da OME. Mais ainda, o *A. otitidis* foi 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, conforme sugerido por HENDOLIN et al. (1999) e LESKINEN et al. (2002). É importante frisar que o *A. otitidis* foi a bactéria mais identificada pela PCR, tanto nas EOM provenientes de crianças com OMR quanto naquelas de crianças com OMEC, prevalecendo igualmente, como se discutirá adiante, entre as crianças maiores de dois anos, e sendo identificado apenas uma vez a menos do que o *H. influenzae* nas efusões daquelas com idade inferior a dois anos.

O *A. otitidis* tem merecido especial atenção daqueles que investigam as possíveis causas bacterianas das otites médias. A freqüente localização intracelular e a presença associada de muitas células inflamatórias sugerem um papel patogênico para o microrganismo (BOSLEY et al., 1995; HENDOLIN et al., 1997; 1999). Também sua identificação em efusões de maior duração e de aparência mucóide estaria associada a estágios mais crônicos de OME (LESKINEN et al., 2002). Desde a publicação pioneira de FADEN e DRYJA (1989) e a classificação do germe por AGUIRRE e COLLINS (1992b),

um número expressivo de pesquisas demonstrou uma prevalência importante (20 a 50%) do *A. otitidis* na EOM de pacientes com OME, considerando-a também uma evidência para sua classificação como um patógeno da orelha média (HENDOLIN et al., 1997; 1999; BESWICK et al., 1999; JERO et al., 1999; LESKINEN et al., 2002). Como citado anteriormente, o crescimento deste germe em meios de cultura é difícil, e só foi obtido nos EUA. No entanto, vários pesquisadores têm identificado o *A. otitidis* através da PCR, na América do Norte, Europa e Japão. A partir da contribuição de Sih, uma amostra coletada no Brasil foi incluída num desses estudos e resultou positiva para o germe, tanto por cultura quanto pela PCR (BOSLEY et al., 1995).

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. O *A. otitidis* é um bom exemplo desse grupo e foi até agora encontrado somente em amostras de efusão de OME, exceto em dois estudos, de JERO et al. (1999) e HARYMAIA et al. (2001), que identificaram o microrganismo em amostras de efusão de OMA. 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 (BOSLEY et al., 1995). O trabalho elegante de TARKKANEN et al. (2000) demonstrou que o germe tem potencial imunestimulatório, induzindo a ativação de linfócitos T CD8⁺ supressores da citotoxicidade, o que poderia sugerir a capacidade de suprimir a síntese de anticorpos, resultando numa eliminação ineficiente da bactéria na caixa timpânica. Segundo os mesmos autores, a já comprovada menor competência da imunidade mediada por anticorpos de

algumas crianças com OMEC e OMR explicaria o efeito patogênico do *A. otitidis* nessas formas de otite média.

A frequência com o que o *A. otitidis* foi identificado no presente estudo alinha-se entre as mais altas descritas na literatura e pode representar uma variação geográfica, o que sugere a necessidade da realização de outras investigações em nosso país. Além disso, justifica a efetivação de estudos acerca dos seus sítios de colonização e de suas características de resistência aos antimicrobianos. Por fim, a presença tão prevalente desta bactéria na EOM de pacientes com OME, referida na literatura internacional e também encontrada nesta pesquisa, merece justa valorização, e seu possível efeito patogênico, que pode expressar-se no prolongamento da persistência da efusão na orelha média, deve ser estudado mais profundamente.

7.5 Comparação da Frequência e Tipo de Germe Encontrados em Pacientes com OMR e OMEC

Das 128 EOM estudadas, 68,0% provinham de pacientes com OMR e 32,0% daqueles 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. (2000), que apontou percentuais de 57,2% (OMR) e 42,8% (OMEC), guardando semelhança com os dados da presente pesquisa.

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. (1999, 2000) não referiram uma distribuição diferente do *A. otitidis*, JERO et al. (1999) e LESKINEN et al. (2002) encontraram-no mais freqüentemente em efusões com mais de três meses de duração (OMEC). Já JERO e KARMA (1997a) detectaram mais pneumococos (mas também hemófilos) em efusões com menos de dois meses de duração, incluindo, portanto crianças com OMR e excluindo aquelas com OMEC. BROOK et al. (2001) também encontraram mais pneumococos (mas também hemófilos) em quem tinha menos tempo de efusão, mas seu ponto de corte foi cinco meses. Percebe-se aqui a falta de uniformidade na apresentação dos dados e a dificuldade na adoção de definições dos diversos tipos de otite média. Mesmo que se leve isso em consideração, deve-se lembrar que os pacientes incluídos na presente pesquisa deveriam ter efusão por mais de seis semanas e ausência de sintomatologia aguda da orelha média (OME), subdividindo-se entre aqueles que tivessem apresentado três ou mais episódios de OMA em seis meses (OMR) e os que persistiam com efusão por mais de três meses (OMEC). 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. Isto pode explicar, neste estudo, o achado no exame cultural, onde o *S. pneumoniae* foi identificado somente uma vez a menos do que o *H. influenzae* nas amostras de OMR, sem ter nunca sido isolado em efusões de OMEC.

BROOK et al. (2001) já afirmaram que “está comprovado que as EOM de crianças com OME de menor duração, quando geram exames culturais positivos, apresentam os patógenos usualmente 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.

7.6 Comparação dos Achados Bacteriológicos Obtidos pela PCR em Crianças

Menores e Maiores de Dois Anos

A escolha dos resultados obtidos pela PCR para esta comparação justifica-se pela maior habilidade demonstrada por este método para detectar a presença de bactérias nas amostras de EOM. Além disso, a ordenação dos germes em função da sua prevalência não se altera em relação àquela apontada pelo exame cultural, exceção feita ao *A. otitidis*.

O grupo das crianças maiores de dois anos contribuiu com o dobro das amostras das crianças menores (86 x 42). Isso era esperado, já que a idade das crianças incluídas no estudo variou de 11 meses a 9 anos e 4 meses (média = 34,7 meses) e que, apesar do período de maior incidência de OM ser o primeiro ano de vida, os pacientes eram portadores de OME, tentaram outras formas de tratamento e foram acompanhados

atentamente até que a miringotomia com colocação de tubo de ventilação mostrasse ser a melhor opção terapêutica.

Apesar da discrepância acima citada, não houve diferença entre as frequências das bactérias nos dois grupos, excetuando-se o *H. influenzae*, que foi mais encontrado em crianças menores de dois anos de uma forma estatisticamente significativa ($P=0,049$). Mais evidência para esse comportamento dos hemófilos deriva do fato de ser esta a única comparação em que sua frequência é maior do que a do *A. otitidis*, tornando-o o germe mais prevalente entre as crianças menores de dois anos incluídas neste estudo. JERO e KARMA (1997a) e BROOK et al. (2001), 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. Não se pode esquecer, porém, de que os resultados desta pesquisa mostraram que o pneumococo foi identificado em 19,0% das crianças menores e em somente 9,3% daquelas maiores de dois anos, sem que, no entanto, esses números alcançassem significância estatística. Já LESKINEN et al. (2002), 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. (1978) não identificaram qualquer diferença relacionada à idade. JERO et al. (1996), JERO e KARMA (1997a) e BROOK et al. (2001) mostraram uma frequência geral de isolamento e identificação bacteriana maior em crianças com menos de dois anos de idade, o que não se confirmou nesta pesquisa. LIU et al. (1975), estudando pacientes com OME, relataram que as taxas de isolamento bacteriano diminuía proporcionalmente ao aumento dos níveis de

IgA, IgG e lisozimas na efusão da orelha média que ocorria com o avançar da idade, salientando a baixa concentração de anticorpos em pacientes com menos de dois anos de vida. O significado de todos esses achados não está completamente esclarecido, até porque alguns são parcialmente discordantes. Por outro lado, 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.

7.7 Determinação da Resistência à Penicilina

Um total de 26 isolados das bactérias consideradas patogênicas para a orelha média (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*) foram submetidos aos testes escolhidos para avaliar seus perfis de resistência à penicilina, e este número reduzido certamente restringe o valor das observações.

A ausência de crescimento do *A. otitidis* em qualquer das amostras de EOM encaminhadas para cultura impediu a efetivação de exames que buscassem elucidar o perfil de resistência aos antimicrobianos apresentado por este germe, ainda pouco conhecido.

Streptococcus pneumoniae

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, como provocado uma reavaliação dos antibacterianos de escolha e renovado o interesse nas pesquisas de monitorização microbiológica. No presente estudo, o *S. pneumoniae* mostrou-se resistente à penicilina em 62,5% das vezes, juntando-se os dados de resistência intermediária (37,5%) com os de resistência plena (25%).

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, mas é evidente que há um aumento na incidência ao longo do tempo, com lugares como a Espanha, onde se registra uma alteração de 6% em 1979 para 71% em 1997 (FENOLL et al., 1991; HEDLUND et al., 1995; GARCÍA-MARTOS et al., 1997; DAGAN et al., 2000). Por outro lado, estudos específicos de amostras de EOM oriundas de pacientes com OME demonstraram taxas entre 38 e 70% (SUTTON et al., 2000; HADDAD JR. et al., 2000; SIH, 2002).

Em nosso país, estudos de monitorização da susceptibilidade do pneumococo, que não incluíram amostras de EOM, encontraram taxas de resistência entre 3,2 e 40%, sendo os percentuais mais baixos relatados nas pesquisas mais antigas (CHATKIN et al., 1989; SESSEGOLO et al., 1994; SADER et al., 1999; ZETTLER, 2000; DiFABIO et al., 2001).

Os fatores de risco para infecção por pneumococos resistentes apresentados por KLEIN (1999) 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 OM tratados com esses medicamentos. JACOBS et al. (1999) mostrou 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 até explicar as taxas elevadas aqui obtidas. Já McCracken JR. (1998) afirmou que a maioria das cepas de pneumococo penicilino-resistente demonstra resistência intermediária, o que também aconteceu com a pequena amostra aqui estudada.

Haemophilus influenzae

Comprovando-se a produção de β -lactamase, e entendendo esta capacidade como sinônimo de resistência à penicilina e a outros agentes β -lactâmicos, encontraram-se 23% de *H. influenzae* resistentes a esses antimicrobianos. Já na década de 80, BLUESTONE et al. (1992) identificaram 20-30% dos hemófilos encontrados em crianças com OM como produtores de β -lactamase, e a análise específica de efusões de OME revelou 41,5 a 65% de *H. influenzae* resistentes (HADDAD JR., 2000; SUTTON et al., 2000; SIH, 2002). No Brasil, o Programa SENTRY detectou 11,8% de hemófilos penicilino-resistentes em amostras provenientes do trato respiratório (SADER et al., 1999), e uma importante contribuição de SIH (2001) encontrou 14% de produção da enzima em germes detectados em efusões de OMA. Esses relatos sugerem que os índices de *H. influenzae* produtores de β -lactamase sejam um pouco mais baixos no Brasil do que em outras regiões, o que poderia explicar o número por nós encontrado (23%). Uma vez mais,

o reduzido número de isolados de *H. influenzae* (13) pode limitar o significado destas observações.

Moraxella catarrhalis

Já a interpretação dos dados sobre a capacidade de produção de β -lactamase por parte da *M. catarrhalis* é mais fácil e provavelmente sofre menos a limitação naturalmente imposta pelo pequeno número de vezes em que a bactéria foi isolada pelo exame cultural (5). Todas as moraxelas identificadas neste estudo eram resistentes à penicilina e a outros agentes β -lactâmicos, pois produziam β -lactamase. Estudos norte-americanos com amostras de efusões de OMA e OME já apontavam índices de 100% de produção da enzima no final da década de 80 (BLUESTONE et al., 1992). Mesmo ao serem incluídas apenas amostras de EOM de OME, as taxas de resistência à penicilina foram muito elevadas, entre 90 – 100% (HADDAD JR. et al., 2000; SUTTON et al., 2000; SIH, 2002). No Brasil, SIH (2001), ao estudar crianças com OMA, igualmente encontrou *M. catarrhalis* produtoras de β -lactamase em 100% das vezes, permitindo sugerir que, em nosso meio, o comportamento do germe repete o referido na literatura nacional e internacional.

Os achados do presente estudo, acerca da distribuição dos germes resistentes, indicaram que estes foram mais freqüentemente identificados em amostras de OMR e em efusões provenientes de crianças menores de dois anos de idade, sem, no entanto, alcançar significância estatística. DOWELL et al. (1999) referiram que o risco de infecção por cepa resistente associava-se à exposição repetida e freqüente a antibióticos e à idade abaixo de dois anos, com o que os dados desta pesquisa aparentemente concordam. É indiscutível que

o reduzido número de isolados bacterianos avaliados impede conclusão de maior relevância, mas sugere, por outro lado, que o aumento do número de amostras permitiria o achado de informações com significância estatística, corroborando o já apontado nas publicações internacionais.

A literatura tem-se mostrado pródiga no registro do aumento evidente e continuado da incidência de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos usualmente utilizados. Vários fatores têm sido descritos como co-responsáveis por esta ocorrência, e o uso freqüente e algumas vezes abusivo, de antimicrobianos recebe destaque entre eles (BLUESTONE et al., 1992; McCracken JR., 1998). 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.

Esforços dirigidos à prevenção das otites médias devem associar-se à intervenção nos fatores de risco e à redução do emprego de antibióticos, esta última por meio da definição de critérios mais rigorosos e apoiados em evidências, para a prescrição dos antimicrobianos.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

1. A prevalência geral das bactérias em amostras de efusões da orelha média de crianças com OME submetidas à miringotomia foi 25,1% (19,6% para as quatro bactérias estudadas) por cultura e 85,9% pela PCR. Os resultados individuais foram: *H. influenzae*, 10,2% e 39,1%; *S. pneumoniae*, 6,3% e 12,5%; *M. catarrhalis*, 3,9% e 10,2%, por cultura e pela PCR, respectivamente. O *H. influenzae* foi o germe mais prevalente entre os patógenos principais da orelha média, confirmando sua maior ocorrência em OME. O *A. otitidis* não foi identificado por cultura, mas foi detectado em 52,3% das efusões pela PCR, tornando-se o germe mais prevalente na análise por este método. Os dados não diferem significativamente daqueles referidos na literatura específica, e sugerem que bactérias podem desempenhar um papel na patogênese da OME.
 2. A diferença entre as efusões positivas na cultura e na PCR foi estatisticamente significativa para as bactérias incluídas na pesquisa, individual e coletivamente, fazendo com que a PCR mostrasse maior detecção de positividade do que o exame cultural. O acréscimo dos dados obtidos pela PCR representou, em relação ao
-

exame cultural, um aumento de 340% no número total de efusões identificadas como positivas para um dos germes estudados. A PCR parece ser essencial para a detecção do *A. otitidis*.

3. O *A. otitidis* foi o germe mais encontrado nas efusões da orelha média de pacientes com OME por meio da análise com a PCR, e essa elevada prevalência sugere mais investigações sobre sua atuação nas doenças da orelha média.
 4. O *S. pneumoniae* foi mais freqüentemente 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 freqüência do pneumococo na OMR sugere que a bacteriologia da OME de menor duração guarde alguma semelhança com aquela encontrada na OMA.
 5. A distribuição das bactérias foi semelhante nas efusões de crianças menores e maiores de dois anos de idade, excetuando-se o *H. influenzae*, cujo percentual de detecção foi superior nas crianças menores, de forma estatisticamente significativa.
 6. Os percentuais de resistência à penicilina do *S. pneumoniae* (62,5%) na presente amostra são mais elevados do que os referidos no Brasil, mas semelhantes àqueles encontrados em crianças com otite média de outros países. O percentual de *H. influenzae* produtores de β -lactamase (23%) é mais baixo que aqueles relatados na literatura internacional, mas mostra-se similar aos encontrados em nosso país, concordando com a existência de variações geográficas nos padrões de resistência aos antimicrobianos. O percentual de *M. catarrhalis* produtora de β -lactamase é 100%, e coincide com dados nacionais e internacionais.
-
-

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott M, Byrne B, Kwok S, Sninsky J, Poiesz B, Erlich GD. Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting pro-viral DNA amplified in vitro. *J Infect Dis* 1988; 158: 1158-69.
 2. Aguirre M, Collins MD. Development of a polymerase chain reaction-probe test for identification of *Alloiococcus otitis*. *J Clin Microbiol* 1992a; 30: 2177-80.
 3. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of *Alloiococcus otitis* gen. nov., sp. nov., an organism from human middle ear fluid. *Int J Syst Bacteriol* 1992b; 42: 79-83.
 4. Álho O, Kilkku O, Oja H, Koivu M, Sorri M. Control of the temporal aspect when considering risk factors for acute otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 444-9.
 5. Álho OP, Laara E, Oja H. What is the natural history of recurrent acute otitis media in infancy? *J Fam Pract* 1996; 43: 258-64.
 6. Álho OP, Oja H, Koivu M, Sorri M. Risk factors for chronic otitis media with effusion in infancy: each acute otitis media episode induces a high but transient risk. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 839-43.
 7. Aniansson G, Alm B, Andersson B, Hakansson A, Larsson P, Nylen O, et al. A prospective cohort study on breast-feeding and otitis media in Swedish infants. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 183-8.
-

8. Apostolopoulos K, Xenelis J, Tzagaroulakis A, Kandiloros D, Yiotakis J, Papafragou K. The point prevalence of otitis media with effusion among school children in Greece. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; 44: 207-14.
 9. Arola M, Ruuskanen O, Ziegler T, Mertsola J, Nanto-Salonen K, Putto-Laurila A, et al. Clinical role of respiratory virus infection in acute otitis media. *Pediatrics* 1990; 86: 848-55.
 10. Ataoglu H, Göksu N, Kemaloglu YK, Bengisun S, Özbilen S. Preliminary report on L-forms: possible role in the infectious origin of secretory otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994; 103: 434-8.
 11. 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.
 12. Barenkamp SJ, St Geme JW 3rd. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable Haemophilus influenzae are part of gene clusters. *Infect Immun* 1994; 62: 3320-8.
 13. Barnett ED, Klein JO. The problem of resistant bacteria for the management of acute otitis media. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 509-17.
 14. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. Study of the Moraxella group: I. Genus Moraxella and the Neisseria catarrhalis group. *J Bacteriol* 1968; 95: 58-73.
 15. Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP, Pahor AL, Brown NL. Detection of Alloiococcus otitis in mixed bacterial populations from middle-ear effusions of patients with otitis media. *Lancet* 1999; 354: 386-89.
 16. Bhagavati S, Ehrlich GD, Kula RW, Kwok S, Sninsky J, Udani V, et al. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus-type I DNA and antigen in spinal fluid and blood of patients with chronic progressive myelopathy. *N Engl J Med* 1988; 318: 1141-47.
 17. Bikhazi P, Ryan AF. Expression of immunoregulatory cytokines during acute and chronic middle ear immune response. *Laryngoscope* 1995; 105: 629-34.
-

18. Block SL, Harrison CJ, Hedrick J, Tyler R, Smith A, Hedrick R. Restricted use of antibiotic prophylaxis for recurrent acute otitis media in the era of penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001; 61: 47-60.
 19. 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]
 20. Bluestone CD, Klein JO. Definitions, terminology and classification. In: Bluestone CD, Klein JO, editors. *Otitis Media in Infants and Children*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995a. p. 1-3.
 21. Bluestone CD, Klein JO. Otitis media, atelectasis, and eustachian tube dysfunction. In: Bluestone CD, Stool SE, Kenna MA, editors. *Pediatric Otolaryngology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 388-582.
 22. Bluestone CD, Klein JO. Physiology, pathophysiology and pathogenesis. In: Bluestone CD, Klein JO, editors. *Otitis media in infants and children*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995b. p. 17-37.
 23. Bluestone CD, Paradise JL, Beery QC. Physiology of the eustachian tube in the pathogenesis and management of middle ear effusions. *Laryngoscope* 1972; 82: 1654-70.
 24. Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: S7-S11.
 25. Bluestone CD. Definitions, terminology and classification. In: Rosenfeld RM, Bluestone CD, editors. *Evidence-based otitis media*. Hamilton: BC Decker; 1999. p. 85-103.
 26. Bluestone CD. Epidemiology and pathogenesis of chronic suppurative otitis media: implications for prevention and treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; 42: 207-23.
-

27. Bluestone CD. Otitis media. In: Johnson JT, Yu VL, editors. Infectious diseases and antimicrobial therapy of the ears, nose and throat. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 273-91.
 28. Bosley GS, Whitney A, Pruckler J, Moss W, Daneshvar M, Sih T, et al. Characterization of ear fluid isolates of *Alloioococcus otitidis* from patients with recurrent otitis media. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2876-80.
 29. Boswell JB, Nienhuys TG. Onset of otitis media in the first eight weeks of life in Aboriginal and non-Aboriginal Australian infants. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 542-9.
 30. Boswell JB, Nienhuys TG. Patterns of persistent otitis media in the first year of life in Aboriginal and non- Aboriginal infants. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 893-900.
 31. Brook I, Gober AE. Bacterial colonization of pacifiers of infants with acute otitis media. *J Laryngol Otol* 1997; 111: 614-5.
 32. Brook I, Yocum P, Shah K, Feldman B, Epstein S. Aerobic and anaerobic bacteriologic features of serous otitis media in children. *Am J Otolaryngol* 1983; 4: 389-92.
 33. 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.
 34. Brook I, Yocum P, Shah K. Aerobic and anaerobic bacteriology of concurrent chronic otitis media with effusion and chronic sinusitis in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126: 174-76.
 35. Calder MA, Croughan MJ, McLeod DT, Ahmad F. The incidence and antibiotic susceptibility of *Branhamella catarrhalis* in respiratory infections. *Drugs* 1986; 31 (suppl 3): 11-6.
 36. Cantekin EI. Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA* 1996; 275: 186.
-

37. Carlin SA, Marchant CD, Shurin PA, Johnson CE, Super DM, Rehmus JM. Host factors and early therapeutic response in acute otitis media. *J Pediatr* 1991; 118: 178-83.
 38. Casselbrant ML, Brostoff LM, Cantekin EI, Flaherty MR, Doyle WJ, Bluestone CD, et al. Otitis media with effusion in preschool children. *Laryngoscope* 1985; 95: 428-36.
 39. Casselbrant ML, Mandel EM, Fall PA, Rockette HE, Kurs-Lasky M, Bluestone CD, et al. The heritability of otitis media: a twin and triplet study. *JAMA* 1999; 282: 2125-30.
 40. Casselbrant ML, Mandel EM, Kurs-Lasky M, Rockette HE, Bluestone CD. Otitis media in a population of black American and white American infants, 0-2 years of age. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1995; 33: 1-16.
 41. Casselbrant ML, Mandel EM. Epidemiology. In: Rosenfeld RM, Bluestone CD, editors. Evidence-based otitis media. Hamilton: BC Decker; 1999. p. 117-36.
 42. Castagno L, Lavinsky L. Otitis media in children: seasonal changes and socioeconomic level. 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. 119-23.
 43. 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.
 44. Chonmaitree T, Owen MJ, Howie VM. Respiratory viruses interfere with bacteriologic response to antibiotic in children with acute otitis media. *J Infect Dis* 1990; 162: 546-9.
 45. Chonmaitree T, Patel JA, Lett-Brown MA, Uchida T, Garofalo R, Owen MJ, et al. Virus and bacteria enhance histamine production in middle ear fluids of children with acute otitis media. *J Infect Dis* 1994; 169: 1265-70.
 46. Collet JP, Larson CP, Boivin JF, Suissa S, Pless IB. Parental smoking and risk of otitis media in pre-school children. *Can J Public Health* 1995; 86: 269-73.
-

47. Committee on Infectious Diseases. Therapy for children with invasive pneumococcal infections. *Pediatrics* 1997; 99: 289-99. [American Academy of Pediatrics]
 48. Costa SS, D'Avila C, Cruz OL. Otite média com efusão. In: Cruz OL e Costa SS, editores. *Otologia clínica e cirúrgica*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000a. p. 163-70.
 49. Costa SS, Ruschel C, Cruz OL, Paparella MM. Otites médias – aspectos gerais. In: Cruz OL, Costa SS, editores. *Otologia clínica e cirúrgica*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000b. p. 137-61.
 50. Costa SS, Souza LCA. Otite média crônica não-colesteatomatosa. In: Campos CA e Costa HO, editores. *Tratado de otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca; 2002. p. 72-92.
 51. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-45.
 52. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-12.
 53. Critchley IA, Blosser RS, Karlowsky JA, Yamakita J, Barth A, Sader HS, et al. Antimicrobial resistance in respiratory pathogens isolated in Brazil during 1999-2000. *Braz J Infect Dis* 2001; 5: 294-304.
 54. 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.
 55. Dagan R. Clinical significance of resistant organisms in otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 378-382.
 56. Daly KA, Brown JE, Lindgren BR, Meland MH, Le CT, Giebink GS. Epidemiology of otitis media onset by six months of age. *Pediatrics* 1999a; 103: 1158-66.
 57. Daly KA, Casselbrant ML, Hoffman HJ, Ingvarsson LB, Kvaerner KJ, Tos M, et al. Recent advances in otitis media. 2. Epidemiology, natural history, and risk factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 2002; 188: 19-25. [Recent advances in otitis media: Report of the Seventh Research Conference]
-

58. Daly KA, Hunter LL, Giebink GS. Chronic otitis media with effusion. *Pediatr Rev* 1999b; 20: 85-94.
 59. Daly KA. Epidemiology of otitis media. *Otolaryngol Clin North Am* 1991; 24: 775-86.
 60. De Souza Marques HH, Yamamoto M, Sakane PT, Caiaffa-Filho HH, Figueiredo Mendes CM. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 433-4.
 61. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Burton AH, Brendel KA, Smith DC, et al. Epi Info: a word-processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers [electronic resource] Version 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention/Division of Surveillance and Epidemiology Program Office; 1996.
 62. DeMaria TF, Prior RB, Briggs BR, Lim DJ, Birck HG. Endotoxin in middle-ear effusions from patients with chronic otitis media with effusion. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 15-7.
 63. DeMaria TF. Endotoxin and otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1988; 132: 31-3.
 64. DeWeese DD, Saunders WH. Diseases of the middle ear and mastoid. In: DeWeese DD, Saunders WH, editors. *Textbook of Otolaryngology*. 4th ed. St. Louis: CV Mosby; 1973. p. 350-67.
 65. 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.
 66. Dingman J, Rayner M, Mishra S, Zhang Y, Ehrlich M, Post J, et al. Relation between presence of viable bacteria and presence of endotoxin in middle-ear effusions. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3417-19.
 67. Doyle WJ, Skoner DP, Hayden F, Buchman CA, Seroky JT, Fireman P. Nasal and otologic effects of experimental influenza A virus infection. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994; 103: 59-69.
-

68. Dowell SF, Butler JC, Giebink GS, Jacobs MR, Jernigan D, Musher DM, et al. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance – a report from the drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* therapeutic working group. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 1-9.
 69. Duffy LC, Faden H, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D. Exclusive breastfeeding protects against bacterial colonization and day care exposure to otitis media. *Pediatrics* 1997; 100(4): E7.
 70. Duncan B, Ey J, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Taussig LM. Exclusive breast-feeding for at least 4 months protects against otitis media. *Pediatrics* 1993; 91: 867-72.
 71. Ehrlich GD, Glaser JB, LaVigne K, Quan D, Mildvan D, Sninsky JJ, et al. Prevalence of human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) type II infection among high risk individuals : type-specific identification of HTLVs by polymerase chain reaction. *Blood* 1989; 74: 1658-64.
 72. Engel J, Anteunis L, Volovics A, Hendriks J, Marres E. Risk factors of otitis media with effusion during infancy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 48: 239-49.
 73. Ey JL, Holberg CJ, Aldous MB, Wright AL, Martinez FD, Taussig LM. Passive smoke exposure and otitis media in the first year of life. Group Health Medical Associates. *Pediatrics* 1995; 95: 670-7.
 74. Faden H, Brodsky L, Bernstein J, Stanievich J, Krystofik D, Shuff C, et al. Otitis media in children: local immune response to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1989; 57: 3555-59.
 75. Faden H, Waz MJ, Bernstein JM, Brodsky L, Stanievich J, Ogra PL. Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100:612-5.
 76. 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.
-

77. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis* 1997; 175: 1440-5.
 78. Faden H, Harabuchi Y, Hong JJ. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media. *J Infect Dis* 1994a; 169: 1312-7.
 79. Faden H, Hong I, Murphy T. Immune response to outer membrane antigens of *Moraxella catarrhalis* in children with otitis media. *Infect Immun* 1992; 60: 3824-9.
 80. Faden H, Hong J, Pahade N. Immune response to *Moraxella catarrhalis* in children with otitis media: Opsonophagocytosis with antigen-coated latex beads. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994b; 103: 522-5.
 81. Felmingham D, Gruneberg RN. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 191-203.
 82. Fenoll A, Martin Bourgon C, Muñoz R, Vicioso D, Casal J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 56-60.
 83. 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 de Otorrinolaringol* 1998; 64: 604-8.
 84. Forsgren J, Blomberg S, Samuelson AG, Jonasson J, Christensson B. Cytokine production in situ in adenoid tissue with intracellular *H. influenzae* infections. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrant M, Klein JO, Ogra PL, editors. *Recent advances in otitis media: Proceedings of the Sixth International Symposium, 1995, June 4-8, Fort Lauderdale, Fla.* Hamilton: BC Decker; 1996. p. 300-2.
 85. Forsgren J, Rynnel-Dagöö B, Samuelson AG. The microbe. In: Johnson JT, Yu VL, editors. *Infectious diseases and antimicrobial therapy of the ears, nose and throat.* Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 9-34.
-

86. Fraise AP, Pahor AL, Beswick AJ. Otitis media with effusion: the role of *Alloiococcus otitidis*. *Ann Med* 2001; 33: 1-3.
 87. Freijd A, Bygdeman S, Rynnel-Dagöö B. The nasopharyngeal microflora of otitis-prone children, with emphasis on *H. influenzae*. *Acta Otolaryngol* 1984; 97:117-26.
 88. Fritscher CC. Reação em cadeia pela polimerase no diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis carinii* em portadores de síndrome da imunodeficiência adquirida [tese]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1993.
 89. Fry NK, Rowbotham TJ, Saunders NA, Embly TM. Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 67: 165-8.
 90. García-Martos P, Galán F, Marin P, Mira J. Increase in high resistance to penicillin of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Cádiz, Spain. *Chemotherapy* 1997; 43: 179-81.
 91. Gates GA, Avery CA, Cooper Jr JC, Prihoda TJ. Chronic secretory otitis media: effects of surgical management. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1989; 138: 2-32.
 92. Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 1993; 61: 1538-43.
 93. Gehanno P, Pannajotopoulos A, Barry B, Nguuyen L, Levy D, Bingen E, et al. Microbiology of otitis media in the Paris, France area from 1987 to 1997. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 570-3.
 94. 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.
 95. Giebink GS, Mills EL, Huff JS, Edelman CK, Weber ML, Juhn SK, et al. The microbiology of serous and mucoid otitis media. *Pediatrics* 1979; 63: 915-9.
 96. Giebink GS. Otitis media update: pathogenesis and treatment. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101: 21-3.
 97. Giebink GS. Progress in understanding the pathophysiology of otitis media. *Pediatr Rev* 1989a; 11: 133-8.
-

98. Giebink GS. The microbiology of otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1989b; 8: S18-S20.
 99. Gok U, Bulut Y, Keles E, Yalcin S, Doymaz M. Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001; 60: 49-54.
 100. 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.
 101. Goldbart A, Yagupsky P, Markus N, Fraser D, Dagan R. Prevalence of antimicrobial resistance among pneumococcal isolates from children with otitis media in southern Israel. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 521-3.
 102. 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.
 103. Haddad Jr. J. Treatment of acute otitis media and its complications. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27: 431-41.
 104. Hakansson A, Kidd A, Wadell G, Sabharwal H, Svanborg C. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1994; 62: 2707-14.
 105. Hansman D, Glasgow H, Sturt J, Devitt L, Douglas R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Engl J Med* 1971; 284: 175-7.
 106. Harabuchi Y, Faden H, Yamanaka N, Duffy L, Wolf J, Krystofik D. Human milk secretory IgA antibody to nontypeable *Haemophilus influenzae*: possible protective effects against nasopharyngeal colonization. *J Pediatr* 1994; 124: 193-8.
 107. Harimaya A, Fujii N, Mitsuzawa H, Yamazaki N, Himi T. Evaluation of specific antibody against *Alloiococcus otitidis* 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.
-

108. Harsten G, Prellner K, Heldrup J, Kalm O, Kornfält R. Recurrent acute otitis media: a prospective study of children during the first three years of life. *Acta Otolaryngol* 1989; 107: 111-9.
 109. 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.
 110. Heikkinen T, Chonmaitree T. Increasing importance of viruses in acute otitis media. *Ann Med* 2000; 32: 157-63.
 111. Hendolin P, Karkkainen U, Himi T, Markkanen A, Ylikoski J. High incidence of *Alloiococcus* otitis in otitis media with effusion. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 860-65.
 112. 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.
 113. Hendolin P, Paulin L, Ylikoski J. Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 125-32.
 114. Hermans PWM, Sluitjer M, Elzenaar K. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the Netherlands: results of a 1-year molecular epidemiology survey. *J Infect Dis* 1997; 175: 1413-22.
 115. Hildesheim ME, Hoffman HJ, Overpeck MD. Frequent ear infections in association with child-care characteristics, based on the 1988 Child Health Supplement to the National Health Interview Survey. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999; 13: 466-72.
 116. Hoffman HJ, MacTurk RH, Gravel JS. Epidemiological risk factors for otitis media and hearing loss in school age children based on NHANES III, 1988-1994. In: Lim DJ, editor. *Recent advances in otitis media: Seventh International Symposium: Fort Lauderdale, Fla, 1999.* p. 59. [Abstracts]
 117. Homoe P, Christensen RB, Bretlau P. Acute otitis media and sociomedical risk factors among unselected children in Greenland. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 49: 37-52.
-

118. Homoe P, Christensen RB, Bretlau P. Prevalence of otitis media in a survey of 591 unselected Greenlandic children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996; 36: 215-30.
 119. 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 Pediatr Otol* 1993; 27: 119-126.
 120. Howie VM, Ploussard JH, Sloyer J. The "otitis-prone" condition. *Am J Dis Child* 1975; 129: 676-8.
 121. Hykin PG, Tobal K, McIntyre G, Matheson MM, Towler HM, Lightman SL. The diagnosis of delayed post-operative endophthalmitis by polymerase chain reaction of bacterial DNA in vitreous samples. *J Med Microbiol* 1994; 6: 408-15.
 122. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 242-56.
 123. 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.
 124. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* 1978; 299: 735-40.
 125. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Zilles A, Lin G, Pankuch GA, Appelbaum PC. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1901-8.
 126. Jero J, Leskinen K, Virolainen A, Hendolin P, Ylikoski J. The role of *Alloicoccus otitidis* in the continuum of otitis media in children. *Recent advances in otitis media: Seventh International Symposium: Fort Lauderdale, Fla, 1999.* p. 195. [Abstracts]
 127. Jero J, Karma P. Bacteriological findings and persistence of middle ear effusion in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997a; 529: 22-6.
-

128. Jero J, Karma P. Prognosis of acute otitis media: factors associated with the development of recurrent acute otitis media. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997b; 529: 30-3.
 129. Jero J, Virolainen A, Salo P, Leinonen M, Eskola J, Karma P. PCR assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear of children with otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 288-292.
 130. Johnson MD, Fitzgerald JE, Leonard G, Burleson JA, Kreutzer DL. Cytokines in experimental otitis media with effusion. *Laryngoscope* 1994; 104: 191-6.
 131. Joki-Erkkilä VP, Laippala P, Pukander J. Increase in pediatric acute otitis media diagnosed by primary care in two Finnish municipalities. – 1994-5 versus 1978-9. *Epidemiol Infect* 1998; 121: 529-34.
 132. Jokipii AMM, Karma P, Ojala K. Anaerobic bacteria in chronic otitis media. *Arch Otolaryngol* 1977; 103: 278-80.
 133. Juhn S, Paparella M, Kim C, Goycoolea M, Giebink G. Pathogenesis of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1977; 86: 481-92.
 134. Jung TTK, Linda L. Prostaglandins, leukotrienes, and other arachidonic acid metabolites in the pathogenesis of otitis media. *Laryngoscope* 1988, 98: 980-93.
 135. Jung TTK, Rhee CK. Otolaryngologic approach to the diagnosis and management of otitis media. *Otolaryngol Clin North Am* 1991; 24: 931-45.
 136. Jung TTK, Park YM, Schlund D, Weeks D, Miller S, Wong O, et al. Effect of prostaglandin, leukotriene, and arachidonic acid on experimental otitis media with effusion in chinchillas. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1990; 148: 28-32.
 137. Kawana M, Kawana C, Giebink GS. Penicillin treatment accelerates middle ear inflammation in experimental otitis media. *Infect Immun* 1992; 60: 1908-12.
 138. Kim SN, Kim SW, Choi IH, Pyo SN, Rhee DK. High incidence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea. *Microb Drug Resist* 1996; 2: 401-6.
 139. Kirkwood BR. *Essentials of medical statistics*. Oxford: Blackwell; 1988.
-

140. Klein JO, Tos M, Casselbrant ML, Daly K. Epidemiology and natural history. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1998; 174: 9-13. [Recent advances in otitis media: Report of the Sixth Research Conference]
 141. 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.
 142. Klein JO. Management of otitis media: 2000 and beyond. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 383-7.
 143. Klein JO. Microbiologic efficacy of antibacterial drugs for acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 973-5.
 144. Klein JO. Otitis media. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 823-33.
 145. Kramer AH, McCullough DW. The prevalence of otitis media with effusion among Inuit children. *Int J Circumpolar Health* 1998; 57(Suppl 1): 265-7.
 146. Krenke C, Stephensen JS, Wald ER. Incidence of organisms in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1988; 133: 20-1. [Studies in otitis media. Pittsburgh Otitis Media Research Center progress report-1988: abstracts]
 147. Kvaerner KJ, Nafstad P, Hagen JA, Mair IW, Jaakkola JJ. Early acute otitis media and siblings' attendance at nursery. *Arch Dis Child* 1996a; 75: 338-41.
 148. Kvaerner KJ, Nafstad P, Hagen JA, Mair IW, Jaakkola JJ. Recurrent acute otitis media: the significance of age at onset. *Acta Otolaryngol* 1997a; 117: 578-84.
 149. Kvaerner KJ, Tambs K, Harris JR, Magnus P. Distribution and heritability of recurrent ear infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997b; 106: 624-32.
 150. Kvaerner KJ, Tambs K, Harris JR, Mair IW, Magnus P. Otitis media: relationship to tonsillitis, sinusitis and atopic diseases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996b; 35: 127-41.
 151. Kwok S, Mack DH, Mullis KB, Poiesz B, Ehrlich G, Blair D, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 1987; 61: 1690-4.
 152. Lanphear BP, Byrd RS, Auinger P, Hall CB. Increased prevalence of recurrent otitis media among children in the United States. *Pediatrics* 1997; 99(3): E1.
-

153. Leake ER, Holmes K, Lim DJ, DeMaria TF. Peptidoglycan isolated from nontypeable *Haemophilus influenzae* induces experimental otitis media in the chinchilla. *J Infect Dis* 1994; 170: 1532-8.
 154. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen-Julkunen A, Ylikoski J, Jero J. The clinical role of *Alloiococcus otitidis* in otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 66: 41-8.
 155. Levin AS, Teixeira LM, Sessegolo JF, Barone AA. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to antimicrobials in São Paulo, Brazil: clinical features and serotypes. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1996; 38: 187-92.
 156. Lewis DM, Schram JL, Birck HG, Lim DJ. Antibody activity in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979; 88: 392-6.
 157. Liebling MR, Arkfeld DG, Michelini GA, Nishio MJ, Eng BJ, Jin T, et al. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* in synovial fluid using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 1994; 5: 702-9.
 158. Liederman EM, Post JC, Aul JJ, Sirko DA, White GJ, Buchman CA, et al. Analysis of adult otitis media: polymerase chain reaction versus culture for bacteria and viruses. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998; 107: 10-16.
 159. Lim DJ, DeMaria TF. Panel discussion: pathogenesis of otitis media. *Bacteriology and immunology. Laryngoscope* 1982; 92: 278-86.
 160. Liu YS, Lim DJ, Lang RW, Birck HG. Chronic middle ear effusions: immunochemical and bacteriological investigations. *Arch Otolaryngol* 1975; 101: 278-86.
 161. Lous J, Fiellau-Nikolajsen M. Epidemiology of middle-ear effusion and tubal dysfunction: a one year prospective study comprising monthly tympanometry in 387 non-selected seven-year-old children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1981; 3: 303-17.
 162. MacTurk RH, Hoffman HJ, Overpeck MD. Risk factors for frequent ear infections in US children: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). In: Lim DJ, editor. *Recent advances in otitis media: Seventh International Symposium: Fort Lauderdale, Fla, 1999.* p. 228. [Abstracts]
-

163. Marchant CD, Shurin PA, Turcxyk VA, Wasikowski DE, Tutihasi MA, Kinney SE. Course and outcome of otitis media in early infancy: a prospective study. *J Pediatr* 1984; 104: 826-31.
 164. Matar G, Sidani N, Fayad M, Hadi U. Two-step PCR-based assay for identification of bacterial etiology of otitis media with effusion in infected Lebanese children. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1185-8.
 165. May Pereira M. Fatores de virulência microbiana. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1997. p. 3-19.
 166. McCracken Jr. GH. Treatment of acute otitis media in an era of increasing microbial resistance. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 576-9.
 167. Menéndez R, Córdoba J, de La Cuadra P, Cremades MJ, Lopez-Hontagas JL, Salavert M, et al. Value of polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1868-73.
 168. Meyerhoff WL, Giebink GS. Panel discussion: pathogenesis of otitis media: pathology and microbiology of otitis media. *Laryngoscope* 1982; 92: 273-7.
 169. Miller PH, Facklam RR, Miller JM. Atmospheric growth requirements for *Alloiococcus* Species and related Gram-Positive Cocci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1027-8.
 170. Mogi G, Suzuki M. The role of IgE-mediated immunity in otitis media: fact or fiction? In: Bernstein J, Faden H, Henderson D, Ryan A, Barbara M, Quaranta A, editors. *Immunologic Diseases of the Ear*. New York: The New York Academy of Sciences; 1997. p. 61-9.
 171. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
 172. Nafstad P, Hagen MS, Oie L, Magnus P, Jaakkola JJ. Day care centers and respiratory health. *Pediatrics* 1999; 103: 753-8.
 173. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. GenBank. *Alloiococcus otitidis* [site na Internet]. Disponível em:
-

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=alloiococcus+otitidis>. Acessado em 02 de junho de 2001.
174. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 5th ed. Wayne, PA: NCCLS, 2000. [Series: NCCLS, M7-A5 = v.20, no. 2]
 175. Niemelä M, Uhari M, Mottonen M. A pacifier increases the risk of recurrent acute otitis media in children in day care centers. *Pediatrics* 1995; 96: 884-8.
 176. Nissen MD, Sloots TP. Rapid diagnosis in pediatric infectious diseases: the past, the present and the future. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 605-12.
 177. Nonomura N, Giebink GS, Zelterman D, Harada T, Juhn SK. Early biochemical events in pneumococcal otitis media: arachidonic acid metabolites in middle ear fluid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100: 385-8.
 178. Ogra PL, Barenkamp SJ, Mogi G, Murphy TF, Bakaletz LO, Bernstein JM, et al. Microbiology, immunology and vaccination. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1998; 174: 29-49. [Recent advances in otitis media. Report of the Sixth Research Conference]
 179. Ogra PL, Bernstein JM, Yurchak AM, Coppola PR, Tomasi Jr TB. Characteristics of secretory immune system in human middle ear: implications in otitis media. *J Immunol* 1974; 112: 488-95.
 180. Okamoto Y, Kudo K, Ishikawa K. Presence of respiratory syncytial virus genomic sequences in middle ear fluid and its relationship to expression of cytokines and cell adhesion molecules. *J Infect Dis* 1993; 168: 1277-81.
 181. Paparella MM. Middle ear effusions definitions and terminology. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976; 85: 8-11.
 182. Paparella MM. Modified report of the Ad Hoc Committee on definition and classification of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; 89: 6-8.
 183. Paradise JL, Bluestone CD, Felder H. The universality of otitis media in fifty infants with cleft palate. *Pediatrics* 1969; 44: 35-42.
-

184. Paradise JL, Rockette HE, Colborn DK, Bernard BS, Smith CG, Kurs-Lasky M, et al . Otitis media in 2253 Pittsburgh-area infants: prevalence and risk factors during the first two years of life. *Pediatrics* 1997; 99: 318-33.
 185. Patel JA, Ogra PL. Host defense. In: Johnson JT, Yu VL, editors. *Infectious diseases and antimicrobial therapy of the ears, nose and throat*. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 18-34.
 186. Patel JA, Sim T, Owen M, Howie V, Chonmaitree T. Middle ear fluid levels of TNF- α and MIP-1- α in acute bacterial/viral otitis media. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrant M, Klein JO, Ogra PL, editors. *Recent advances in otitis media: Proceedings of the Sixth International Symposium, 1995, June 4-8, Fort Lauderdale, Fla.* Hamilton: BC Decker; 1996. p. 95.
 187. Peizhong L, Whatmough K, Birchall JP, Wilson JA, Pearson JP. Does the bacterial DNA found in middle ear come from viable bacteria? *Clin Otolaryngol* 2000; 25: 570-6.
 188. Pelton SI. Acute otitis media in an era of increasing antimicrobial resistance and universal administration of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 599-604.
 189. Piltcher OB, Swarts JD, Magnuson K, Alper CM, Doyle WJ, Hebda PA. A rat model of otitis media with effusion caused by eustachian tube obstruction with and without *Streptococcus pneumoniae* infection: methods and disease course. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126: 490-8.
 190. Pitkaranta A, Jero J, Arruda E, Virolainen A, Hayden F. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus and coronavirus in otitis media with effusion. *J Pediatr* 1998; 133: 390-394.
 191. 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* 1996a; 17: 106-11.
-

192. 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.
 193. Post JC, White GJ, Aul JJ, Zavoral T, Wadowsky RM, Zhang Y, et al. Development and validation of a multiplex PCR-based assay for the upper respiratory tract bacterial pathogens *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. *Mol Diagn* 1996b; 1: 29-39.
 194. Postma DS, Poole MD, Wu SM, Tober R. The impact of day care on ventilation tube insertion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1997; 41: 253-62.
 195. Pukander J, Luotonen J, Sipila M, Timonen M, Karma P. Incidence of acute otitis media. *Acta Otolaryngol* 1982; 93: 447-53.
 196. Pukander J, Sipilä M, Karma P. Occurrence of and risk factors in acute otitis media. In: Lim DJ, Senturia BH, Ohio State University. Dept. of Otolaryngology, Ohio State University. Center for Continuing Medical Education, editors. Recent advances in otitis media with effusion. Third International Symposium, 1983 May 17-20, Fort Lauderdale, Fla. Philadelphia: BC Decker; 1984. p. 9-12.
 197. Qvarnberg Y, Kantola O, Valtonen H, Vuori E, Salo J, Toivanen M. Bacterial findings in middle ear effusion in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102: 118-21.
 198. Ramirez J, Ahkee C, Tolentino A, Miller RD, Summersgill JT. Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory tract infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 7-14.
 199. 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.
 200. Reddy MS, Murphy TF, Faden HS, Bernstein JM. Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrant M, Klein JO, Ogra PL, editors. Recent advances in otitis media: Proceedings of the Sixth International
-

- Symposium, 1995, June 4-8, Fort Lauderdale, Fla. Hamilton: BC Decker; 1996. p. 307-10.
201. Relman DA, Loutil JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990; 323: 1573-80.
 202. 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.
 203. 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.
 204. Ripley-Petzoldt ML, Giebink GS, Juhn SK, Aeppli D, Tomasz A, Tuomanen E. The contribution of pneumococcal cell wall to the pathogenesis of experimental otitis media. *J Infect Dis* 1988; 157: 245-55.
 205. Rovers MM, Hofstad EA, Franken-van den Brand KI, Straatman H, Ingels K, van der Wilt GJ, et al. Prognostic factors for otitis media with effusion in infants. *Clin Otolaryngol* 1998; 23: 543-6.
 206. Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2661-6.
 207. Sadé J. Pathology and pathogenesis of serous otitis media. *Arch Otolaryngol* 1966; 84: 297-305.
 208. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Winokur P, Kugler KC, Pfaller MA, et al. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). SENTRY Latin America Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 289-301.
 209. 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.
-

210. Saffer M, Lubianca Neto JF, Piltcher OB, Petrillo VF. Chronic secretory otitis media: negative bacteriology. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 836-9.
 211. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324: 163-6.
 212. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
 213. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
 214. Sassen ML, Brand RB, Grote JJ. Risk factors for otitis media with effusion in children 0 to 2 years of age. *Am J Otolaryngol* 1997; 18: 324-30.
 215. Schappert SM. Office visits for otitis media: United States, 1975-90. *Adv Data* 1992; (214): 1-19. [Vital and Health Statistics of the Centers for Disease Control/National Center for Health Statistics]
 216. Schwartz B. Otite média com efusão. In: Sih T, editora. *Infectologia em otorrinopediatria*. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 203-7.
 217. Senturia BH, Bluestone CD, Klein JO, Lim DJ, Paradise JL. Report of the ad hoc committee on definition and classification of otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; 89:3-4.
 218. Senturia BH, Gessert CF, Carr CD, Baumann ES. Studies concerned with tubotympanitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1958; 67: 440-67.
 219. Sessegolo JF, Levin AS, Levy CE, Asensi M, Facklam RR, Teixeira LM, et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 906-11.
 220. Shigemi H, Kurono Y, Shimamura K, Mogi G. Role of secretory immunoglobulin A in nasopharyngeal bacterial adherence. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Bakaletz LO, DeMaria TF, Ohio State University Center for Continuing Education, et al., editors. *Recent Advances in Otitis Media: Proceedings of the Fifth*
-

- International Symposium; 1991 May 20-24, Fort Lauderdale, Fla. Burlington: Decker Periodicals; 1993. p. 182.
221. Shimamura K, Shigemi H, Kurono Y, Mogi G. The role of bacterial adherence in otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 116: 1143-6.
222. Sih T, Schwartz G, Bosley G, Facklam R. Chronic otitis media with effusion caused by *Alloiococcus otitidis*: clinical and laboratory features. In: American Society of Microbiology. Thirty Second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington: The Society, 1992. p. 222.
223. Sih T. Acute otitis media in Brazilian children: analysis of microbiology and antimicrobial susceptibility. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 662-6.
224. 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.
225. Sipilä M, Pukander J, Karma P. Incidence of acute otitis media up to the age of 1^{1/2} years in urban infants. *Acta Otolaryngol* 1987; 104: 138-45.
226. Sirakova T, Kolattukudy PE, Murwin D, Billy J, Leake E, Lim D, et al. Role of fimbriae expressed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in pathogenesis of and protection against otitis media and relatedness of the fimbrin subunit to outer membrane protein A. *Infect Immun* 1994; 62: 2002-20.
227. Sloyer JL, Howie VM, Ploussard JH, Johnston RB. The immune response to acute otitis media in children. II: Serum and middle ear fluid antibody in otitis media due to *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1975; 132: 685-8.
228. SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows, Rel. 11.0.1.2001. Chicago: SPSS Inc.; 2001.
229. Stenfors L, Räsänen S. How long do middle ear pathogens survive in mucoid effusion material. *Acta Otolaryngol* 1989; 107: 244-8.
230. Stenfors L, Räsänen S. Quantitative analysis of the bacterial findings in otitis media. *J Laryngol Otol* 1990; 104: 749-57.
-

231. Stenstrom C, Ingvarsson C. Otitis-prone children and controls: a study of possible predisposing factors. I. Heredity, family background and perinatal period. *Acta Otolaryngol* 1997a; 117: 87-93.
 232. Stenstrom C, Ingvarsson C. Otitis-prone children and controls: a study of possible predisposing factors. II. Physical findings, frequency of illness, allergy, day care and parental smoking. *Acta Otolaryngol* 1997b; 117: 696-703.
 233. Stool SE, Berg AO, Berman S, Sylvan ES. Otitis media with effusion in young children. Rockville: US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Health Care Policy and Research; 1994. [Series: Clinical practice guideline; no. 12 / AHCPR publication 94-0622]
 234. Stool SE, Field MJ. The impact of otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8(1 Suppl): S11-4.
 235. Sundberg L, Cederberg A, Edén T, Ernestson S. Bacteriology in secretory otitis media. *Acta Otolaryngol* 1981; 384: 18-25.
 236. 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.
 237. Suzuki K, Bakaletz LO. Synergistic effect of adenovirus type 1 and nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of experimental otitis media. *Infect Immun* 1994; 62: 1710-8.
 238. Swarts JD, Alper CM, Seroky JT, Chan KH, Doyle WJ. In vivo observation with magnetic resonance imaging of middle ear effusion in response to experimental underpressures. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 522-8.
 239. Tarkkanen J, Carlson P, Himi T, Ylikoski J, Atshushi H, Mattila P. Stimulation of adenoidal lymphocytes by *Alloiococcus otitidis*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109(10): 958-64.
 240. Teele DW, Healy GB, Tally FP. Persistent effusions of the middle ear. Cultures for anaerobic bacteria. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980; 89(3 Pt 2): 102-3.
-

241. Teele DW, Klein JO, Rosner B, Greater Boston Otitis Media Study Group. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis* 1989; 160: 83-94.
 242. Ueyama T, Kurono Y, Shirabe K, Takeshita M, Mogi G. High incidence of *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal secretions and middle ear effusions as detected by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1835-8.
 243. Uhari M, Kontiokari T, Niemelä M. A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics* 1998; 102: 879-84.
 244. Uhari M, Kontiokari T, Niemelä M. Effect of xylitol on the resolution of middle ear effusion in acute otitis media. In: Lim DJ, editor. *Recent advances in otitis media: Seventh International Symposium*. Fort Lauderdale, Fla, 1999a. p. 238. [Abstracts]
 245. Uhari M, Niemelä M, Pihakari O. Pacifier as a risk factor for acute otitis media. In: Lim DJ, editor. *Recent advances in otitis media: Seventh International Symposium*. Fort Lauderdale, Fla, 1999b. p. 229. [Abstracts]
 246. Uhari M, Mäntysaari K, Niemelä M. A meta-analytic review of the risk factors for acute otitis media. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1079-83.
 247. Van Ketl RJ, DeWever B, Van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol* 1990; 33: 271-6.
 248. Verghese A. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. In: Johnson JT, Yu VL, editors. *Infectious diseases and antimicrobial therapy of the ears, nose and throat*. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 171-5.
 249. Vesa S, Kleemola M, Blomquist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 574-81.
 250. Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2667-70.
-

251. Von Graevenitz A. Revisited nomenclature of *Alloiococcus otitis*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 472.
 252. Wallace Jr RJ, Nash DR, Steingrube VA. Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Am J Med* 1990; 88(5A): 46S-50S.
 253. White BL, Doyle WJ, Bluestone CD. Eustachian tube function in infants and children with Down syndrome. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Department of Otolaryngology/Ohio State University College of Medicine, Center for Continuing Medical Education/Ohio State University College of Medicine, editors. *Recent advances in otitis media with effusion: Proceedings of the Third International Symposium, 1983, May 17-20, Fort Lauderdale, Fla.* Philadelphia: BC Decker; 1984. p. 62-6.
 254. Wilson KH, Blitchingham RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1942-6.
 255. Wilson KH, Blitchington R, Frothingham R, Wilson JP. Phylogeny of the Whipple's disease-associated bacterium. *Lancet* 1991; 338: 474-5.
 256. Yang CY, Hung CF, Lai TC, Hwang KC. Effects of indoor environmental factors on risk for acute otitis media in a subtropical area. *J Toxicol Environ Health A* 1999; 56: 111-9.
 257. Yellon RF, Leonard G, Marucha PT, Craven R, Carpenter RJ, Lehmann WB, et al. Characterization of cytokines present in middle ear effusions. *Laryngoscope* 1991; 101: 165-9.
 258. Zeisel SA, Roberts JE, Neebe EC, Riggins R Jr, Henderson FW. A longitudinal study of otitis media with effusion among 2- to 5-year-old African-American children in child care. *Pediatrics* 1999; 103: 15-9
 259. Zettler EW. Diagnóstico molecular e epidemiologia da resistência antimicrobiana do *Streptococcus pneumoniae* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) [tese]. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
-

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS NA ORELHA MÉDIA DE CRIANÇAS SUBMETIDAS À MIRROROTOMIA

Sobre o estudo:

O médico otorrinolaringologista diagnosticou otite média recorrente ou otite média com efusão crônica em seu (sua) filho (a) e indicou a realização de miringotomia com colocação de tubo de ventilação. Você já recebeu explicações detalhadas sobre o tratamento cirúrgico indicado para seu filho e concordou com sua realização.

Nesta pesquisa gostaríamos de identificar quais os germes que podem ser encontrados na secreção da orelha média, por ocasião da realização da miringotomia. Para isto, a secreção que é aspirada será enviada para exame cultural no laboratório do hospital onde o procedimento cirúrgico está sendo realizado. Esta aspiração da secreção faz parte dos procedimentos normais na cirurgia.

O estudo terá a duração aproximada de doze meses. Um total de 70 pacientes entre 9 meses e 12 anos participará deste estudo.

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o número 02-311.

Qual será seu papel neste estudo?

Nós ficaríamos gratos se você concordar em permitir que seu filho participe do estudo. Se o fizer, a secreção aspirada da orelha média será enviada para exames microbiológicos. Todos os cuidados pós-operatórios são determinados e prestados pelo médico otorrinolaringologista de seu filho e não sofrem modificações pela inclusão no estudo.

Você pode negar-se a participar do estudo?

Sim, tanto a sua participação quanto a de seu filho são inteiramente voluntárias. Seu filho continuará a receber todos os cuidados necessários e aos quais tem direito.

Existem riscos na participação no estudo?

A participação no estudo não modifica os riscos do procedimento cirúrgico a ser realizado no seu filho e com o qual você já concordou. Como já foi dito, a aspiração da secreção que existe atrás do tímpano é um procedimento normal nesta cirurgia e este material é normalmente descartado.

Quais são os benefícios associados a este estudo?

Seu filho e outras pessoas podem beneficiar-se no futuro de uma pesquisa como esta. Tais benefícios incluem a possibilidade de melhores esquemas de tratamento.

Os registros de seu filho permanecerão confidenciais?

Tanto a sua participação com a de seu filho neste estudo serão tratadas como estritamente confidenciais. A sua identidade e a de seu filho permanecerão confidenciais.

E quanto às despesas?

Todas as despesas da realização dos exames laboratoriais da secreção são de responsabilidade do pesquisador.

Os honorários do procedimento cirúrgico e do acompanhamento médico otorrinolaringológico são de responsabilidade do paciente ou de seu responsável.

Se você tiver quaisquer outras perguntas referentes a este estudo, o médico pesquisador terá prazer em discuti-las com você.

Número do paciente no estudo: _____

Eu, _____, li e compreendi todas as informações anteriores descrevendo esta pesquisa clínica, e todas as perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Consinto voluntariamente na participação de meu filho neste estudo.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____ / ____ / ____ (se apto a fornecer seu consentimento)

Nome e assinatura dos pais ou guardião: _____ / ____ / ____

Nome e assinatura do Pesquisador: Maria Beatriz Rotta Pereira (telefone p/contato: 3222-8909) _____

Assinatura do Professor Orientador: _____

Anexo 2 – Instrumento de coleta de dados: protocolo de pesquisa

Projeto de pesquisa: Bacteriologia da orelha média

FICHA CLÍNICA:

Sexo: M F

Nome

Nº do paciente

Data de nascimento/idade

Fones

Data da cirurgia

Indicação OMR

Cirúrgica OMEC

Tempo de efusão dias

Nº/semestre

meses

Tipo de Cirurgia:

TT

TT+ Ad

TT+Ad+T

ANAMNESE:

História familiar de OM S N

Pais fumantes S N

Creche ou escola S N

Tempo de leite materno

Primeira otite média

EXAMES AUDIOMÉTRICOS:

- Audiometria:
- Imitancimetria:

SINAIS E SINTOMAS:

Otalgia

Sensação orelha tapada

↓ Audição

Irritabilidade

Mão na orelha

Dorme mal

Alimentação

Febre

Obstrução nasal

Adenóides

Rinite alérgica

Diarréia

HISTÓRIA PRÉVIA:

Atopia S N

Cirurgia otológica S N

Último antibiótico S N

Qual:

Quando:

CONDIÇÕES DE CO-MORBIDADE:

Fenda palatina ou submucosa

Síndrome ou malformações craniofaciais

Retardo no desenvolvimento

Hiperatividade ou déficit de atenção

Retardo na linguagem e fala

Hipoacusia neurosensorial

MICROSCOPIA TRANS-OPERATÓRIA

	OD	OE
MT retraída	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Secreção na orelha média	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperemia MT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Abaulamento MT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Timpanosclerose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tipo de secreção:		
serosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
mucopurulenta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
mucóide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

REVISÕES PÓS-OPERATÓRIAS:

RESULTADO:	OD	OE
PCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bacterioscópico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cultura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>