



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS RELAÇÕES
PARASITO-HOSPEDEIRO

VERALUCE PAOLINI CAVALCANTI

***Staphylococcus aureus* EM TONSILAS DE PACIENTES COM**
FARINGOTONSILITE AGUDA RECORRENTE:
PREVALÊNCIA, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Goiânia

2013

VERALUCE PAOLINI CAVALCANTI

***Staphylococcus aureus* EM TONSILAS DE PACIENTES COM
FARINGOTONSILITE AGUDA RECORRENTE:
PREVALÊNCIA, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
das Relações Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cláudia
Dantas Porfirio Borges André

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Carla Afonso da
Silva Bitencourt Braga

Goiânia

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

C376s Cavalcanti, Veraluce Paolini.
Staphylococcus aureus em tonsilas de pacientes com faringotonsilite aguda recorrente [manuscrito] : prevalência, perfil de suscetibilidade e caracterização genotípica / Veraluce Paolini Cavalcanti. - 2013.
xiv, 71 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André; Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e abreviaturas.

Anexos.

1. *Staphylococcus aureus* – Faringotonsilite. 2. Faringotonsilite – Antimicrobiano. 3. Tonsilite – Antibioticoterapia. I. Título.

CDU: 611.32:615.281.9

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Veraluce Paolini Cavalcanti

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga

Membros:

1. Prof^a Dr^a Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André

2. Prof^a Dr^a Juliana Lamaro Cardoso

3. Prof^a Dr^a Alessandra Marques Cardoso

Data: 17/ 10 /2013

DEDICATÓRIA...

Eles simplesmente foram excepcionais, verdadeiros guerreiros, parceiros, amigos fiéis e exemplos. Foram o conforto na hora de desânimo e as palavras certas nos momentos de dúvidas e incertezas. Durante os dois anos de duração do mestrado foi visível o meu crescimento como pessoa e profissional e aos meus pais dedico essa conquista e as novas etapas que virão. Obrigada pela ajuda e o apoio nas decisões por mim tomadas. Um agradecimento por tudo oferecido, desejado e hoje recompensado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por estar presente em todos os momentos da minha vida e por me mostrar que todas as dificuldades e desafios são apenas passos para eu me tornar uma pessoa melhor. Obrigado por me mostrar, a cada dia, que nada na vida é por acaso.

Aos meus avós que sempre estiveram tão pertinho de mim, e foram o meu porto seguro. Ao meu avô, Giuseppe Paolini, devo os meus melhores valores. À minha avó, Gabriela D’Noro Paolini, agradeço o amor e confiança.

Aos meus pais, Helton e Marisa, pelo incentivo e exemplo de vida. Obrigada por todo amor, carinho e educação que recebo sempre de vocês.

Ao meu querido irmão, Gabriel, pelo carinho e apoio, mostrando-me que o esforço diário e a fé são critérios necessários para uma bela conquista.

Ao meu namorado, Fabiano, por me ajudar em todos os momentos, me acalmando nas horas de medo e insegurança. Obrigada por acreditar sempre na minha capacidade.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André, pela ajuda constante e pelo apoio. Obrigada por ter sido muito mais do que uma orientadora, e sim uma grande amiga e em algumas horas uma verdadeira mãe. Agradeço todos os puxões de orelhas e conselhos.

À Prof^a. Dr^a. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga, minha co-orientadora, pela colaboração na execução deste trabalho. Obrigada por ter me recebido com tanto carinho e amor e por me mostrar que tudo é motivo para um belo sorriso. Em todos os meus momentos de fraqueza e insegurança lembrarei de seu exemplo de vida, com muita força e fé.

Aos amigos do Laboratório, Débora, Ana Gabriela, Priscilla, Nayara, Késia, Maria Juíva, Marcos, Acácio, Tainá, Lorraine e Wesley. O destino me proporcionou

amizades maravilhosas e importantes para a vida toda. Sei que sem vocês a conclusão desse trabalho teria sido impossível.

Aos professores que ofereceram disciplinas durante os dois anos de mestrado. Obrigada pelas aulas ministradas, pela dedicação e paciência.

Aos pacientes que doaram suas tonsilas e sem as quais não seria possível executar o projeto.

Aos médicos que ajudaram na realização da pesquisa e porporcionaram essa experiência.

Agradeço imensamente a todos os professores e pesquisadores que estiveram envolvidos direta ou indiretamente nas etapas de realização dessa pesquisa. Um muito obrigada pelos conselhos, ensinamentos e dedicação.

Ao apoio financeiro do CNPq.

“O maior erro você o comete quando, por medo de se enganar, erra deixando de se arriscar em seu caminho.

Não erra o homem que tenta diferentes caminhos para atingir sua metas. Erra aquele que, por medo de se enganar, não caminha. Não erra o homem que procura a verdade e não a encontra; engana-se aquele que, por medo de errar, deixa de procurá-la”

(René Trossero)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 TONSILAS PALATINAS.....	1
1.2 FARINGOTONSILITES	2
1.2.1 Sintomas clínicos	3
1.2.2 Etiologia	5
1.2.2.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	5
1.2.2.2 Copatógenos	5
1.2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.2.3 Diagnóstico	10
1.2.4 Tratamento	12
1.2.4.1 Antibioticoterapia	12
1.2.4.2 Tonsilectomia.....	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.	19
4.2 AMOSTRAGEM	19
4.3 PROCESSAMENTO DO ESPÉCIME CLÍNICO	20
4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA	23
4.4.1 Teste de suscetibilidade – Disco Difusão	23
4.4.2 Concentração Inibitória Mínima - CIM - E-test[®]	25
4.5 DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>mecA</i> E DA LEUCOCIDINA DE PANTON-VALENTINE	26

4.5.1 Extração do DNA bacteriano	26
4.5.2 PCR para detecção do gene <i>mecA</i>	27
4.5.3 PCR para detecção do gene que codifica a Leucocidina de Panton-Valentine	27
4.6 ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSADO (<i>PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS</i> -PFGE)	28
4.6.1 Condições de digestão e eletroforese	29
4.7 BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO 1	67
ANEXO 2	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tonsila recebida no Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

Figura 2: Tonsila macerada na embalagem plástica.

Figura 3: Isolamento de *Staphylococcus sp.* em Ágar Manitol Salgado.

Figura 4: Identificação de *S. aureus* com evidente β -hemólise em Ágar Sangue.

Figura 5: Verificação do achatamento do halo de inibição indicando resistência induzível à clindamicina.

Figura 6: Técnica de E-test[®] para verificação de resistência à oxacilina.

Figura 7: PCR evidenciando duas cepas com o gene *mecA*.

Figura 8: PCR evidenciando apenas uma cepa portando o gene que codifica a leucocidina de Pantón-Valentine.

Figura 9: Dendrograma obtido da análise por PFGE de *S. aureus* isolados de pacientes submetidos à tonsilectomia em hospital escola de Goiânia, Goiás.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de tonsilectomia por sexo e idade em pacientes atendidos em hospital escola de Goiânia, Goiás, 2012.

Tabela 2: Prevalência de microrganismos isolados de 123 pacientes submetidos à tonsilectomia em hospital escola de Goiânia, Goiás, 2012.

Tabela 3: Prevalência de *S. aureus* por sexo e idade em pacientes atendidos em um hospital escola de Goiânia, Goiás, 2012.

Tabela 4: Perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com faringotonsilites de repetição submetidos à tonsilectomia.

Tabela 5: Perfis de suscetibilidade dos *S. aureus* isolados de tonsilas provenientes de pacientes com tonsilite de repetição.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* metilina resistente associado à comunidade (do inglês *Community-Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*)

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CL: *Cluster*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

LMP: *Low Melting Point* agarose

MDR: Multidrogra-resistência

MLSb: Macrolídeos – Lincosaminas – Streptogramina B

MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MSSA: *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*

NaCl: Cloreto de Sódio

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

OSPC: *Oceania Southwest Pacific Clone*

PBP: *Penicillin Binding Protein*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PFGE: Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

PVL: Leucocidina de Panton-Valentine

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSA: *Trypticase Soy Agar*

TSB: *Trypticase Soy Broth*

UFC: Unidade formadora de colônia

UPGMA: *Unweighted Pair – Groups Method with Arithmetic Mean*

USA: *United States of America*

RESUMO

As faringotonsillites bacterianas são infecções das vias aéreas superiores que ocorrem predominantemente em crianças e adolescentes. Devido à composição da microbiota oral é difícil o esclarecimento da participação de cada microrganismo na etiologia da doença. A presença de bactérias produtoras de β -lactamases interfere na eficácia de antimicrobianos β -lactâmicos, os mais utilizados no tratamento destas infecções, favorecendo a recorrência da doença. *S. aureus* é um dos patógenos mais frequentes na etiologia das tonsilites e sua relevância se deve à capacidade de resistência aos antimicrobianos e à persistência nos tecidos internos das tonsilas. A tonsilectomia é indicada nos casos de tonsilite recorrente após várias falhas na antibioticoterapia. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *S. aureus* em tonsilas de pacientes submetidos à tonsilectomia, em um hospital escola de Goiânia; o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a caracterização genética dos isolados. Tonsilas obtidas de 123 pacientes foram processadas, os microrganismos identificados e submetidos ao antibiograma por técnicas convencionais. Nos isolados resistentes à cefoxitina, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima - CIM para oxacilina e a detecção da presença do gene *mecA* por PCR. Todos os isolados foram submetidos à PCR para detecção da leucocidina Panton-Valentine e ao PFGE para determinação da similaridade genética. Foram identificados 60 isolados de *S. aureus* de 49 pacientes (39,8%). Não houve diferença significativa da prevalência por sexo e a média de idade dos pacientes do sexo masculino foi menor (8,2 anos) ($p < 0,001$) do que das pacientes (15,3 anos). Em nove (18,4%) dos 49 pacientes houve a identificação de dois ou mais isolados diferentes de *S. aureus*. Os isolados apresentaram resistência de 85,0%, 10,0%, 15,0%, 3,3%, 10,0%, 3,3%, 18,3% e 8,3% para penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, ceftriaxona, eritromicina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina e tetraciclina respectivamente. Todos os isolados foram sensíveis à linezolida e rifampicina. Seis isolados (10,0%) resistentes à eritromicina apresentaram fenótipo de resistência induzível (MLS_{bi}) à clindamicina e quinupristina/dalfopristina. Oito isolados (13,3%) foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Apesar da resistência à cefoxitina ser considerada o

marcador da presença do gene *mecA*, somente em dois isolados resistentes, o mesmo foi detectado sugerindo que a resistência à cefoxitina pudesse ser mediada por outro mecanismo, como a hiperprodução de β -lactamases. Nenhum desses isolados apresentou resistência a mais de duas classes de antimicrobianos. Dos 60 *S. aureus* isolados, somente um apresentou o gene que codifica a leucocidina Panton-Valentine. Neste isolado ainda foi observada resistência a cinco classes de antimicrobianos e fenótipo D. A análise por PFGE agrupou 36 (60,0%) dos 60 isolados em 10 clusters (>80% similaridade), não sendo detectado um clone específico associado à colonização das tonsilas. Porém observamos pacientes diferentes portando *S. aureus* geneticamente idênticos ou com alto grau de similaridade (>80%), sugerindo nestes casos, uma origem comum. A alta prevalência de *S. aureus* nas tonsilas sugere uma capacidade de colonização da superfície e/ou persistência nos tecidos internos das tonsilas. O isolamento de bactérias MDR pode favorecer resistência cruzada de outras bactérias comumente associadas à tonsilite recorrente. Os resultados apontam para mudança no paradigma de diagnóstico e tratamento de tonsilites recorrentes com vistas a viabilizar o uso correto de antimicrobianos e diminuir a recorrência que é a principal causa de tonsilectomia.

ABSTRACT

The bacterial pharyngotonsillitis are infections of the upper airways that occurs predominantly in children and adolescents. Due to the composition of the oral microbiota is difficult to clarify the role of each organism in the etiology of the disease. The presence of bacteria that produce beta-lactamase interferes with the effectiveness of beta-lactam antibiotics, the most commonly drug used in treatment of these infections, promoting the recurrence of the disease. *S. aureus* is one of the most common pathogen in the etiology of tonsillitis and its relevance is due to the ability of antimicrobial resistance and persistence in the tissues of the tonsils. Tonsillectomy is indicated in cases of recurrent tonsillitis after several failures in the antibiotic therapy. The aim of this study was to determine the prevalence of *S. aureus* in the tonsils of patients undergoing tonsillectomy, in a teaching hospital in Goiânia, the antimicrobial susceptibility profile and the genetic characterization of isolates. Tonsils obtained from 123 patients were processed, the microorganisms identified and submitted to antibiogram by conventional techniques. The isolates that presented cefoxitin resistance were submitted to tests to determine the minimum inhibitory concentration - MIC for oxacillin and to detect the presence of the *mecA* gene. All isolates were subjected to PCR for detection of Panton-Valentine leukocidin gene and to PFGE to determine the genetic similarity among them. It was identified 60 *S. aureus* isolates from 49 patients (39.8%). There were no significant difference in prevalence by sex and, the average age of male patients was lower (8.2 years) ($p < 0.001$) than the female patients (15.3 years). Nine out 49 patients (18.4%) presented two or more different *S. aureus* isolates. The isolates presented resistance of 85.0%, 10.0%, 15.0%, 3.3%, 10.0%, 3.3%, 18.3% and 8.3% to penicillin, amoxicillin + ácido clavulânico, cefoxitin, ceftriaxone, erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin and tetracycline, respectively. All isolates were sensitive to linezolid and rifampin. Six erythromycin-resistant isolates (10.0%) showed inducible resistance (MLS_{bi}) to clindamycin and quinupristin/dalfopristin. Eight isolates (13.3%) were resistant to three or more classes of antimicrobials. Despite the resistance to cefoxitin be considered a marker of the presence of the *mecA* gene only in two resistant isolates it has been found,

suggesting that the ceftioxin resistance should be mediated by other mechanisms, such as the overproduction of beta-lactamases. None of these isolates showed resistance to more than two classes of antimicrobials. Among the sixty *S. aureus* isolates, only carried the gene encoding the Panton-Valentine leukocidin. This isolate presented resistance to five classes of antimicrobials and phenotype D. PFGE analysis grouped 36 (60,0%) of 60 isolates in 10 clusters (>80% similarity), since no one specific clone was associated with colonization of the tonsils. It was observed different patients carrying *S. aureus* isolates genetically identical or with a high level of similarity (>80%), suggesting in these cases, a common origin. The high prevalence of *S. aureus* in tonsils suggests an ability to colonize the surface and/or the persistence in the tissues of the tonsils. The isolation of MDR bacteria can promote cross-resistance to other bacteria commonly associated with recurrent tonsillitis. The results point to change the paradigm of diagnosis and treatment of recurrent tonsillitis in order to enable the correct use of antimicrobials to reduce the recurrence which is the main cause of tonsillectomy.

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

Nos serviços públicos de saúde há uma elevada demanda pelos atendimentos às infecções respiratórias. Na especialidade de otorrinolaringologia, pacientes com infecção das vias aéreas superiores, principalmente com tonsilites, infecção das tonsilas palatinas, formam nas unidades de atenção secundária, uma grande fila de espera para a realização da cirurgia de retirada das tonsilas, a tonsilectomia (Scalabrin et al. 2003; Berquó et al. 2004; Guerra et al. 2007). Segundo um estudo realizado em Pelotas, em 396 entrevistados com infecção do trato respiratório, a faringotonsilite representou a principal infecção referida (41,0%) seguida das sinusites (17,0%), bronquites (11,0%), pneumonias (10,0%), otites (7,0%) e gripes/ resfriados (5,0%) (Berquó et al. 2004).

1.1 TONSILAS PALATINAS

Localizadas nas vias aero-digestivas superiores, mais precisamente na região ou fossa amigdaliana, situada entre a região bucal e faríngea, encontram-se as amígdalas ou tonsilas palatinas. Estas fazem parte de um complexo linfático descrito como um agregado de nódulos na junção da cavidade oral com a faringe, denominado anel ou colar de Waldeyer. Esse anel formado pelas tonsilas linguais, palatinas, tubárias e faríngeas, bem como pelo tecido linfoide disseminado na região da faringe, demonstra a riqueza e a complexidade do sistema de defesa da mucosa em contato com o ar e com as substâncias ingeridas (Pereira 1957; Morag & Odra 1975; Filho 1980; Dell'Aringa et al. 2005). Encontradas aos pares, as tonsilas apresentam dimensões, volume e morfologia variáveis, dependendo da idade e da quantidade de processos infecciosos aos quais são expostas durante toda a vida. Modificam-se até a idade senil (Filho 1980; Ross et al. 1993). As tonsilas palatinas fisiologicamente apresentam-se hipertróficas em crianças e adolescentes, com predomínio de tecido linfoide, e na fase adulta tendem a regredir e apresentar uma forma atrófica (Hungria 2000).

Morfologicamente é semelhante a uma “amêndoa”, daí o nome de amígdala, e apresenta duas faces (externa e interna), duas bordas arredondadas

(anterior e posterior) e duas extremidades (superior e inferior), tendo sua face externa revestida por uma cápsula de tecido conjuntivo que delimita o tecido tonsilar (Pereira 1957; Ross et al. 1993). Na sua face interna observa-se pequenos orifícios ou criptas, definidas como fendas irregulares, nas quais encontram-se acumulados, com frequência, restos celulares, restos epiteliais e restos alimentares. Neste local desenvolve uma matéria caseosa, “*caseum*”, em geral fétida, propiciando meio ótimo para o desenvolvimento de microrganismos da boca e do meio externo e favorecendo futuras infecções, as tonsilites (Pereira 1957). Devido à proximidade de estruturas presentes no anel de Waldeyer, acredita-se que o termo mais correto para faringite e tonsilite seria faringotonsilite, pois dificilmente o paciente terá tonsilite isoladamente (Schwartz 2001).

1.2 FARINGOTONSILITES

As faringotonsilites são infecções das tonsilas palatinas desencadeadas, muitas vezes, pela proliferação da microbiota da boca e da faringe em diferentes condições, como nas infecções vizinhas com foco dentário, rinites, sinusites e otites; na diminuição da imunidade local por uma doença infecciosa, gripe, tuberculose, intoxicação; nas mudanças bruscas de temperatura favorecidas pelo frio e maior umidade e na formação de “*caseum*” (Pereira 1957; Filho 1980; Figueiredo et al. 2001).

Podem ser causadas por diversos agentes etiológicos, virais ou bacterianos (Ejzenberg et al. 1998; Stuck et al. 2008). Os vírus, tais como adenovírus, parainfluenza vírus, rinovírus, vírus de Epstein Barr e enterovírus representam os mais comuns agentes causadores das faringotonsilites agudas. Dentre as infecções bacterianas, o estreptococo β -hemolítico do grupo A, também denominado *Streptococcus pyogenes*, representa o agente causal mais comum das faringotonsilites agudas (Kielmovitch et al. 1989; Pichichero 1998). Essa infecção bacteriana acomete principalmente crianças e adolescentes na faixa etária entre 5 e 15 anos (Figueiredo et al. 2001; Bisno et al. 2002; Matos et al. 2007; Stuck et al. 2008).

No entanto, muito se discute a respeito de microrganismos copatógenos, que muitas vezes fazem parte da microbiota do indivíduo, mas podem ser

importantes na etiologia das faringotonsilites, principalmente nas faringotonsilites recorrentes (Bisno et al. 2002; Stuck et al. 2008).

1.2.1 Sintomas clínicos

As tonsilas palatinas podem apresentar inflamações características de fase aguda e fase crônica. Os sintomas clínicos agudos são acompanhados, na maioria dos casos, de febre alta, dor de garganta, alterações inflamatórias da orofaringe, prostração, cefaleia, calafrios, vômitos e dor abdominal, em que cada um destes elementos clínicos pode estar presente com intensidades variadas, ou ausentes (Ejzenberg et al. 1998; Pitrez & Pitrez 2003; Stuck et al. 2008).

Esses sintomas variam de acordo com o agente etiológico responsável pela infecção. Nas faringotonsilites indicativas de etiologia bacteriana, frequentemente, observa-se linfonodos cervicais anteriores inflamados e intumescidos, exsudato branco-acinzentado sobre as tonsilas, presença de edema da úvula, petéquias no palato e hiperemia. Nas infecções em que há uma etiologia viral, a presença de rinorreia, rouquidão, tosse ou diarreia descartam a possibilidade de um foco bacteriano (Bisno et al. 2002; Nascimento-Carvalho & Marques 2006; Winn et al. 2006).

Há, no entanto, uma evidente inespecificidade nos sintomas e, por conseguinte, dificuldades na análise do paciente a fim de definir o diagnóstico correto, principalmente na fase aguda (Nascimento-Carvalho & Marques 2006). Dos Santos & Berezin (2005), por exemplo, identificaram sintomas como petéquias, exsudato e gânglios dolorosos, mais frequentes no grupo das crianças com cultura positiva para *Streptococcus pyogenes*, portanto bacteriana. Em contrapartida, Morais et al. (2009) relataram que as crianças com tonsilite estreptocócica apresentavam frequentemente tosse, exantema escarlatiniforme e petéquias no palato. Na tonsilite não estreptocócica, o sintoma mais frequentemente encontrado foi o exsudato.

A fase crônica da faringotonsilite se manifesta de forma diferente em crianças e adultos. Na infância e adolescência são mais evidentes as tonsilas hipertróficas, caracterizadas pelo aumento irreduzível das tonsilas palatinas, consequência da hiperplasia do tecido linfoide, ocasionando obstrução à

passagem de ar, gerando distúrbios da deglutição e da respiração. Esta condição gera a síndrome da apneia do sono proporcionando interrupção, algumas vezes frequentes, das atividades escolares ou profissionais, alterações no desenvolvimento e distúrbio do comportamento. Essa hipertrofia é acompanhada, muitas vezes, de repetidos surtos inflamatórios agudos febris, as denominadas faringotonsilites de repetição ou faringotonsilites agudas recorrentes (Ross et al. 1993; Hungria 2000).

Para se avaliar subjetivamente a hiperplasia das tonsilas palatinas utiliza-se, na prática clínica, o esquema proposto por Brodsky (1989) em que a avaliação é realizada pelo médico durante a oroscopia e as tonsilas palatinas são classificadas em grau 0 a +4 de acordo com a porcentagem de obstrução da orofaringe: em grau 0 as tonsilas não causam obstrução da orofaringe; em grau +1 as tonsilas apresentam menos de 25% de obstrução da orofaringe; em grau +2 as tonsilas estão prontamente visíveis causando 25 a 50% de obstrução da orofaringe; em grau +3 estão obstruindo 50 a 75% da orofaringe e em grau +4 causam mais de 75% de obstrução da orofaringe.

Nas faringotonsilites recorrentes deve-se levar em conta o número de episódios por ano. A recorrência é observada quando a criança apresenta sete episódios infecciosos em um ano, cinco episódios em cada um dos dois anos consecutivos ou três episódios em cada um dos três anos consecutivos (Discolo et al. 2003; Stuck et al. 2008; Zautner et al. 2010).

Esses episódios de faringotonsilites recorrentes, possivelmente ocorrem devido a um desequilíbrio imunológico na função das tonsilas. Fujihara et al. (2005) sugerem que talvez a consequência da recorrência seja a inibição imunológica da tonsila, com redução da proliferação de células T, induzindo a ausência de resposta antígeno específico. Nesse estudo foi observado que as moléculas ativadoras das células T tiveram expressão diminuída nos grupos onde a doença apresentava-se mais severa e persistente.

A fase crônica da faringotonsilite é definida apenas por análise histopatológica, porém clinicamente a recorrência de infecções em crianças associadas com a hipertrofia das tonsilas pode ter como causa a cronicidade com alteração de tecido tonsilar e serem indicativas de cirurgia. A cronicidade na fase adulta está mais associada à atrofia das tonsilas, devido à substituição do tecido

linfoide por tecido fibroso, e acúmulo de matéria caseosa nas criptas, promovendo halitose marcante, sensação de desconforto, irritação frequente na garganta e sensação de corpo estranho (Ross et al. 1993; Hungria 2000). Este estado não desenvolve um impacto somente físico, mas também um impacto social, pois gera constrangimento aos pacientes, diminui a qualidade de vida e proporciona insegurança no convívio social (Hungria 2000; Dal Rio et al. 2007).

1.2.2 Etiologia

1.2.2.1 *Streptococcus pyogenes*

A bactéria *S. pyogenes* equivale à cerca de 15% a 30% da etiologia de faringotonsilites agudas em crianças entre 5 e 15 anos de idade, mas apenas à 5% a 10% desta doença em adultos (Bisno et al. 2002). É relatada como o principal agente etiológico nas faringotonsilites agudas, na qual a terapia antimicrobiana é indicada (Ejzenberg et al. 1998; Winn et al. 2006).

Infecções das tonsilas por esse agente podem desencadear complicações supurativas e não supurativas. Abscesso peritonsilar, abscesso retrofaríngeo, otite média e sinusites são alguns exemplos de complicações supurativas. As complicações não supurativas são representadas pela febre reumática e a glomerulonefrite (Ejzenberg et al. 1998; Winn et al. 2006). A maior preocupação é com a febre reumática, que pode levar a patologias cardíacas manifestando-se como sopros cardíacos, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva e em alguns casos parada cardíaca irreversível e morte. A febre reumática leva também a artrites nos joelhos, cotovelos, tornozelos e punhos, sendo migratória e regredindo espontaneamente (Bisno et al. 2002; Pitrez & Pitrez 2003; Winn et al. 2006; Stuck et al. 2008).

1.2.2.2 Copatógenos

Vários estudos ao longo dos anos mostram mudanças na composição bacteriana das tonsilas. O *Streptococcus pyogenes*, antes considerado o principal

agente causador das faringotonsilites, encontra-se, muitas vezes, associado à copatógenos nas infecções (Costa et al. 2003; Pereira et al. 2008).

Acredita-se que a infecção tonsilar por copatógenos possa estar relacionada à uma alteração no equilíbrio da microbiota da orofaringe ou nasofaringe que supostamente desencadearia a proliferação de microrganismos, antes comensais, que promovem e, ou mantêm o estado infeccioso na tonsila. Muitos destes agentes infecciosos possuem características que podem dificultar a erradicação do agente primário da doença e passarem a ser um agente secundário, ou se tornarem o principal agente da infecção. Isso pode ocorrer quando copatógenos produzem enzimas β -lactamases que inviabilizam a eficácia do tratamento do paciente com antimicrobianos β -lactâmicos, como por exemplo o *Staphylococcus aureus* (Brodsky et al. 1991; Gunnarsson et al. 2001; Harputluoglu et al. 2005; Brook & Gober 2006; Brook & Foote 2006; Murray et al. 2006; Pichichero & Casey 2007). Tem-se observado ao longo dos anos, que vem ocorrendo uma diminuição da incidência de *Streptococcus pyogenes* e aumento de *Staphylococcus aureus* (Brodsky & Koch 1993).

Esse agente é encontrado nas vias aéreas superiores de indivíduos saudáveis e com infecções. A presença desse microrganismo produtor de β -lactamase pode favorecer a sobrevivência de outros microrganismos sensíveis ao antimicrobiano em um processo infeccioso (Tavares 2001), permitindo tanto o estado carreador, em crianças saudáveis, quanto a falha no tratamento antimicrobiano em crianças com infecções (Brodsky et al. 1991; Gunnarsson et al. 2001; Harputluoglu et al. 2005; Brook & Gober 2006; Brook & Foote 2006; Murray et al. 2006; Pichichero & Casey 2007).

Bactérias consideradas patogênicas como *Haemophilus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* são frequentemente relatadas tanto em crianças com tonsilite de repetição, quanto em crianças com hipertrofia adenotonsilar (Costa et al. 2003; Gul et al. 2007).

1.2.2.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias gram-positivas, particularmente os cocos, são os microrganismos isolados com mais frequência em amostras clínicas (Murray et al. 2006; Winn et al. 2006; Santos et al. 2007). Os estafilococos, um dos principais patógenos humanos são classificados no Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Bacillales*, Família *Staphylococcaceae* e Gênero *Staphylococcus* (Winn et al, 2006).

Na análise microscópica, estes se apresentam em cocos gram-positivos com crescimento padrão que se assemelha a cachos de uvas, podendo também ser encontrados isolados, aos pares, em tétrades e em curtas cadeias. Em sua maioria são anaeróbios facultativos. Produzem a enzima catalase e não são formadores de esporos (Winn et al. 2006; Santos et al. 2007).

Os estafilococos representam alguns dos principais patógenos humanos, causando um amplo espectro de doenças variando de localizadas e superficiais, afetando a pele e o tecido celular subcutâneo, à sistêmicas ou profundas, decorrentes da bacteremia (Trabulsi & Alterthum 2005; Murray et al. 2006; Winn et al. 2006). A espécie *Staphylococcus aureus* representa o patógeno humano de maior importância. Pode ser encontrado nas narinas, nas pregas cutâneas intertriginosas, no períneo, nas axilas e na vagina, podendo ser encontrado também na orofaringe, na nasofaringe e no trato gastrointestinal (Murray et al. 2006; Winn et al. 2006).

A patologia das infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus* está vinculada à interação parasito-hospedeiro, baseada na presença de fatores de virulência da bactéria e nas condições imunológicas do hospedeiro (Murray et al. 2006; Winn et al. 2006; Edwards et al. 2012). Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são os componentes da superfície celular e a produção de toxinas. Os componentes da superfície, como polissacarídeos capsulares, peptidoglicanos, ácidos teicoicos, a produção de enzimas coagulase e hialuronidase, são essenciais para a sua proteção contra o sistema imune do hospedeiro. Em relação às toxinas, destaca-se a produção de hemolisinas e da leucocidina de Panton-Valentine - PVL, que possuem mecanismos de evasão antifagocitária, promovendo a morte celular dos leucócitos e a liberação de citocinas, contribuindo para o desenvolvimento do choque séptico e infligindo graves danos teciduais (Palavecino 2004; Murray et al. 2006; Winn et al. 2006).

A leucocidina de Panton-Valentine é codificada por dois genes, *lukF-PV* e *lukS-PV*, que são transportados por bacteriófagos (Vandenesch et al. 2012). Está relacionada com lesões necróticas de pele, como furunculoses, e grave pneumonia necrotizante, geralmente associada à uma alta letalidade (Lina et al. 1999; Gillet et al. 2002; Palavecino 2004; Winn et al. 2006). A produção desta leucocidina é mais comum em cepas de *S. aureus* associados à comunidade (Lina et al. 1999; Vandenesch et al. 2003).

A penicilina era o fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, porém com o passar dos anos e devido à aquisição de elementos genéticos de resistência, como os plasmídios, as cepas passaram a produzir enzimas β -lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (Williams 1999; Winn et al. 2006).

As enzimas β -lactamases são classificadas segundo sua estrutura primária (classe A a D) e as características funcionais e bioquímicas (grupo I a IV) (Bush et al. 1995; Bush & Jacoby 2010). Entre as enzimas da classe A mediadas por plasmídeos, as penicilinas destacam-se porque ocorrem numa grande variedade de patógenos, incluindo os estafilococos. Uma ferramenta contra essas enzimas é a utilização de associações de antimicrobianos β -lactâmicos com os inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico. Os inibidores de β -lactamases impossibilitam a ação da enzima sobre os β -lactâmicos tornando-o eficiente no combate à bactéria alvo (Bush et al. 1995; Bush & Jacoby 2010).

As bactérias gram-positivas, como os estafilococos, produzem β -lactamases extracelulares, frequentemente em grande quantidade após a indução pelo antimicrobiano correspondente. Em contato com doses adicionais do antimicrobiano a bactéria apenas passa a produzir mais enzimas e essa se torna mais difícil de ser superada (Schaechter et al. 2002). Além disso é importante reconhecer que o constante e irracional uso de antimicrobianos β -lactâmicos tem oferecido uma pressão seletiva em bactérias, promovendo a sobrevivência de microrganismos produtores de diferentes β -lactamases (Drawz & Bonomo 2010; Bush & Jacoby 2010).

Advindo desse desafio em tratar as infecções estafilocócicas com penicilina, o surgimento de penicilinas semi-sintéticas e as penicilinas resistentes

às penicilinas, possibilitou um maior controle dessas infecções, porém logo foram observados casos de *S. aureus* também resistentes a essas drogas. A partir da década de 60, há relatos de casos de *S. aureus* resistentes à penicilinas semi-sintéticas e à penicilinas resistentes à penicilinas (oxacilina), os *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Essa classificação se deve a presença, na parede de peptidoglicano, de uma proteína de ligação de penicilina (PBP) alterada, a PBP2a, devido à presença e expressão do gene *mecA*, conferindo à bactéria uma baixa afinidade a todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (Lowy 2003; Winn et al. 2006).

Esses achados ofereceram à comunidade científica e às instituições de saúde um desafio sobre a maneira de controlar a disseminação desses microrganismos, não somente dentro dos hospitais, mas também na comunidade (Winn et al. 2006; Rozenbaum et al. 2009). A emergência de MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) gera preocupações aos profissionais da saúde em relação às possíveis complicações, como a bacteremia (Rozenbaum et al. 2009).

Atualmente, a alternativa efetiva para o tratamento de infecções causadas por MRSA é a utilização de vancomicina, um antimicrobiano da classe dos glicopeptídeos. Infelizmente, relatos de sensibilidade diminuída e, ou resistência a essa droga já foram relatados. (Hiramatsu et al. 1997; Marchese et al. 2000; Pascuala et al. 2001; Appelbaum 2006; Medrano & Aguado 2010).

Além dos relatos de presença desta bactéria resistente produzindo enzimas protetoras, as β -lactamases, deve-se considerar que uma possível localização desta em um biofilme superficial ou dentro do tecido tonsilar pode contribuir para a resistência ao antimicrobiano, apesar da ausência de um mecanismo de resistência específico (Chole & Faddis 2003; Scalabrin et al. 2003; Swidsinski et al. 2007; Pichichero & Casey 2007; Zautner et al. 2010).

O tratamento, baseado em microrganismos identificados a partir de raspados das superfícies bacterianas após faringotonsilites recorrentes pode ser efetivo apenas contra as bactérias da superfície, permitindo que as bactérias residentes nos tecidos internos das tonsilas persistam (Brodsky et al. 1991; Costa et al. 2003; Brook & Foote 2006; Gul et al. 2007; Pereira et al. 2008).

A localização no tecido interno da tonsila pode representar uma forma de persistência das bactérias. A superfície tonsilar comumente apresenta as

bactérias pertencentes à microbiota oral normal e o tecido interno contém os microrganismos patogênicos (Pichichero & Casey 2007). Gul et al. (2007) observaram diferença significativa entre a contaminação da superfície e tecido interno, especialmente por *H. influenzae* e *S. aureus*. Esta análise foi semelhante aos dados analisados por Timon et al. (1990) que observaram o aumento da frequência de *H. influenzae* e *S. aureus* ao longo dos anos, e diferente em relação à localização, ou seja, maior prevalência no tecido interno tonsilar. Em contrapartida, outros estudos detectaram *S. aureus* tanto no reservatório extracelular quanto intracelular (Zautner et al. 2010).

1.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico do real agente etiológico na infecção tonsilar é de extrema importância no tratamento das faringotonsilites. Na prática, verifica-se ainda que o diagnóstico na tonsilite aguda é voltado especificamente ao *Streptococcus pyogenes*, por este ser ainda o mais comum agente causador de faringotonsilites agudas em crianças e devido às suas possíveis complicações não supurativas (Nascimento-Carvalho & Marques 2006).

A investigação laboratorial deve ser realizada associando a história clínica e epidemiológica do paciente. Sintomas mais prováveis de serem compatíveis com etiologia bacteriana auxiliam e melhoram a acurácia dos testes laboratoriais que são recomendados para o melhor diagnóstico da infecção. O paciente, apresentando sintomas compatíveis de infecção bacteriana, deve ser submetido a teste rápido e, ou à cultura (Nascimento-Carvalho & Marques 2006).

O teste rápido baseia-se na extração enzimática ou química de antígenos do estreptococo do grupo A, em amostras de *swabs* coletadas da orofaringe, realizando posteriormente a técnica de coaglutinação, ensaio imunoenzimático ou aglutinação com partículas de látex para a identificação desse antígeno. A vantagem deste teste está na rapidez e no possível diagnóstico realizado mesmo em uso de antimicrobianos. Porém nos casos de um número reduzido de bactérias, este teste pode apresentar-se negativo e exigir uma confirmação pela cultura (Bisno et al. 2002; Al-Najjar & Uduman 2008; Oplustil et al. 2010).

Portanto, quando o resultado do teste rápido for positivo, indica-se a antibioticoterapia. Caso o teste rápido seja negativo, indica-se a cultura. Com o resultado da cultura positiva indica-se antibioticoterapia, e com a cultura negativa indica-se tratamento sintomático (Nascimento-Carvalho & Marques 2006).

A especificidade e sensibilidade da cultura e testes rápidos são consideravelmente maiores do que a análise clínica feita pelo médico. Devido à inespecificidade nos sintomas clínicos, como já relatado, o diagnóstico laboratorial auxiliará o médico no tratamento correto da infecção e diminuirá o uso desnecessário de antimicrobianos. Dos Santos & Berezin (2005) por exemplo, compararam os sintomas definidos pelo médico e os resultados de cultura para detecção do *Streptococcus pyogenes*. No total de 376 pacientes, a cultura foi positiva em 92 pacientes e negativa em 284. Em contrapartida, a análise do médico definiu 200 pacientes como positivos para *S. pyogenes* e 176 como negativos, apresentando uma sensibilidade e uma especificidade de 79,3% e 53,2%, respectivamente. Este trabalho mostrou que, baseando-se na análise clínica, aproximadamente 47% dos pacientes receberam antimicrobianos inadequadamente e 21% foram casos positivos omitidos.

A correta análise clínica e a determinação do agente causal por métodos laboratoriais possivelmente reduziria o desenvolvimento de infecções recorrentes, devido ao tratamento incorreto, e evitaria a indicação para a realização da tonsilectomia, um procedimento invasivo. Porém, mesmo sendo considerada de grande importância a realização do diagnóstico laboratorial, na prática a sua execução não é uma realidade. Nos serviços públicos de saúde há uma indisponibilidade destes testes, além do fato dos médicos muitas vezes não solicitarem os exames e tratarem erroneamente os pacientes suspeitando de uma faringotonsilite estreptocócica positiva, podendo o paciente estar com uma infecção de causa viral ou de causa bacteriana por outro agente que não o *S. pyogenes* (Sih & Bricks 2008; Stuck et al. 2008).

Balbani et al. (2009) evidenciaram que 95,8% dos pediatras e 91,5% dos otorrinolaringologistas, do estado de São Paulo, não solicitaram exames para diagnóstico laboratorial. O estudo de Scalabrin et al. (2003) observa que em 26 pacientes atendidos nas unidades de saúde da cidade de Maringá - PR, nenhum

teve solicitação de diagnóstico laboratorial e o tratamento foi prescrito baseado apenas em aspectos clínicos.

Desta forma, é de extrema importância que o médico obtenha o diagnóstico correto pelos testes laboratoriais, evitando a exposição do paciente a um tratamento inapropriado com antimicrobianos, e que contribuiria para a não diminuição da ação protetora da microbiota e para a não seleção de resistência bacteriana (Bisno et al. 2002).

1.2.4 Tratamento

1.2.4.1 Antibioticoterapia

As infecções das vias aéreas superiores representam uma das principais doenças respiratórias com considerável número de prescrições de antimicrobianos (Berquó et al. 2004).

Na prática clínica, o tratamento da faringotonsilite ainda é voltado para suspeita do agente etiológico *Streptococcus pyogenes*, sendo que a penicilina permanece como o antimicrobiano de escolha para essa infecção. Os macrolídeos, como a eritromicina, são indicados quando há pacientes com alergia à penicilina. Aos pacientes infectados com cepas resistentes à eritromicina, a clindamicina apresenta-se como uma alternativa. Outros antimicrobianos como as cefalosporinas, e associações de amoxicilina + ácido clavulânico são indicados quando o paciente apresenta um quadro de faringotonsilite recorrente. Esses dois últimos antimicrobianos são mais resistentes à ação da enzima β -lactamase produzida pelos possíveis copatógenos (Nascimento-Carvalho & Marques 2006; Brook 2007a; Matos et al. 2007).

Nos questionários realizados por Balbani et al. (2009) sobre prescrição de antimicrobianos, ambas as especialidades médicas, pediatras e otorrinolaringologistas, priorizavam a administração de penicilina por via oral durante 10 dias. O trabalho identificou que os pediatras utilizavam mais a penicilina benzatina do que os otorrinolaringologistas (19,7% x 2,8%), enquanto estes prescreviam penicilina com inibidor de β -lactamase com maior frequência (9,7% x 3%). Avci et al. (2006) também demonstraram que na prática diária das

clínicas pediátricas de um hospital universitário na Turquia, a amoxicilina isolada ou em associação com o ácido clavulânico representaram as duas principais drogas prescritas pelos médicos.

No tratamento das infecções com suposta ação de copatógenos indica-se o uso de associações, como a amoxicilina + ácido clavulânico, para atingir principalmente as bactérias produtoras de β -lactamase (Brook 2007a). Os inibidores de β -lactamases conseguem se ligar de forma reversível ou irreversível às β -lactamases protegendo o antimicrobiano ao qual está associado, a amoxicilina, da inativação (Winn et al. 2006). O ácido clavulânico expande o espectro da amoxicilina incluindo, dentre outros, os *S. aureus* produtores de penicilinas. A sua disponibilidade oral faz com que seja bastante indicado em consultas ambulatoriais, exercendo um grande impacto no tratamento de infecções respiratórias adquiridas na comunidade (Weckx & Weckx 1988; Drawz & Bonomo 2010).

Além das falhas nos tratamentos com penicilina devido à produção de β -lactamases, outros estudos demonstram haver diferença nos níveis de amoxicilina no tecido tonsilar e no plasma (Brook 2007a; Averono et al. 2010). Averono et al. (2010) relataram em um estudo em Novara, na Itália, com 33 crianças apresentando faringotonsilites recorrentes e hipertrofia tonsilar, níveis plasmáticos altos do antimicrobiano contra níveis baixos no sítio da infecção e, algumas vezes, insuficientes. Sessenta e um por cento (20) das crianças avaliadas apresentavam níveis indetectáveis de amoxicilina no tecido tonsilar, sendo que 75,0% destas apresentavam níveis plasmáticos adequados. Esses dados sugerem alguma alteração na estrutura tonsilar devido às sucessivas infecções, o que dificultaria a penetração do antimicrobiano.

Na prática, mesmo existindo evidências da prevalência de outros agentes na infecção, o tratamento com antimicrobianos ainda é voltado para a suspeita de *S. pyogenes*. Portanto, a administração de antimicrobianos, muitas vezes desnecessária é preocupante para a seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos recomendados (Eliasson et al. 1990; Sih & Bricks 2008; Stuck et al. 2008).

Mundialmente é estimado que mais da metade de todos os medicamentos são prescritos ou vendidos inadequadamente. Muitos médicos prescrevem

medicamentos onde não é necessário e, ou os pacientes não aderem corretamente ao tratamento (WHO 2011).

Balbani et al. (2009) mostraram que muitos médicos, pediatras (10,2%) e otorrinolaringologistas (7,0%), queixam-se do uso excessivo de antimicrobianos para tratamento da dor de garganta em crianças. Relatam que muitos pacientes já chegam ao consultório usando antimicrobianos que foram erroneamente prescritos no pronto socorro, além da possibilidade da automedicação e da prescrição leiga de antimicrobianos efetuadas pelas farmácias.

Scalabrin et al. (2003) relataram em seu estudo, considerando culturas de orofaringe, que apenas 9 dos 32 indivíduos que procuraram as farmácias para aquisição de antimicrobianos, tinham a real necessidade de medicação antimicrobiana. Devido às queixas de febre, mal-estar e dor de garganta, mais de 80,0% destes indivíduos compraram antimicrobianos para efetuar o tratamento.

A administração desnecessária de antimicrobianos pode destruir a microbiota tonsilar, selecionar patógenos bacterianos no sítio infeccioso e tornar o paciente mais suscetível à uma nova infecção. Portanto, é importante reconhecer a prevalência de outras bactérias, como o *Staphylococcus aureus* na patogenia da faringotonsilite recorrente, observar novos padrões de resistência, como os MRSA que podem transferir genes de resistência às outras bactérias e preocupar-se com a perpetuação do estado de portador assintomático nos pacientes que podem ser fontes de disseminação de bactérias pela comunidade (Brook 2001; Sih & Bricks 2008; Braoios et al. 2009).

Além dos perfis de resistência bacteriana à penicilina, observa-se também um aumento de resistência aos macrolídeos pelo crescente uso de antimicrobianos (Seppala et al. 1997; Eizenberg et al. 1998; Lim et al. 2002). A resistência à eritromicina ocorre, entre outros mecanismos evolutivos de resistência, a partir da capacidade bacteriana de modificar o sítio alvo dessa droga por metilação ribossomal, devido à presença de um gene metilase ribossomal, denominado *erm*, podendo levar à resistência cruzada às lincosamidas e estreptograminas B. Esse mecanismo caracteriza o perfil fenotípico MLSb podendo ser induzido ou constitutivo (Weisblum 1995; Leclercq 2002; Lewis & Jorgensen 2005; Gurdal & Kemalettin 2007). Cepas com perfil MLSb induzível apresentam resistência *in vitro* à eritromicina mas são suscetíveis

às lincosaminas e estreptograminas B. O perfil constitutivo é observado quando se detecta resistência a todos os antimicrobianos tipo MLSb (Schmitz et al. 1999).

Outro efeito do uso excessivo de antimicrobianos é a redução do número de bactérias protetoras da microbiota. Microrganismos de fonte exógena e endógena podem causar doença na ausência da microbiota protetora da orofaringe e nasofaringe, composta por bactérias como estreptococos α -hemolíticos e não-hemolíticos, *Prevotella* spp e *Peptostreptococcus* spp, que supostamente foram inibidas pelo uso de antimicrobianos em sucessivas infecções e possibilitou a proliferação de outros microrganismos (Schaechter et al. 2002; Podbielski et al. 2003; Brook 2005; Brook 2013). Estudo realizado em grupos de crianças saudáveis (grupo 1) e tratadas com penicilina para combater faringotonsilite por *S. pyogenes* (grupo 2) demonstrou que 80,0% de crianças saudáveis e 75,0% de crianças tratadas, que não eram portadoras de *S. pyogenes* apresentavam microbiota protetora. Nas crianças que eram portadoras de *S. pyogenes*, a microbiota esteve presente em 35,0% das crianças do grupo 1 e 25,0% das crianças do grupo 2 (Brook & Gober 2006).

Evidentemente, a mudança na microbiota protetora, a prevalência de copatógenos e, portanto o aumento da resistência são diretamente proporcionais ao uso excessivo de antimicrobianos ao longo dos anos (Smith & Coast 2002; Bartoloni et al. 2004; Pichichero & Casey 2007; WHO 2011).

Resistência antimicrobiana tornou-se um problema mundial, gerando gastos governamentais com tratamento, com contenção de surtos e com educação em saúde. Aumenta a prevalência de morbidade, mortalidade e os esforços dos sistemas de vigilância (Smith & Coast 2002).

1.2.4.2 Tonsilectomia

A tonsilectomia representa um dos procedimentos mais comuns realizados em crianças (Hungria 2000; Stuck et al. 2008; Zautner et al. 2010). O método cirúrgico de escolha é a dissecação, retirando todo o tecido tonsilar e eliminando o foco infeccioso (Hungria 2000).

De acordo com os dados de procedimentos hospitalares do SUS (SIH/SUS) no estado de Goiás, no período de 2010 a 2012, dentre as cirurgias

das vias aéreas superiores, da face, da cabeça e do pescoço, a tonsilectomia (amigdalectomia) foi a principal cirurgia realizada, juntamente com a adenoidectomia, na faixa etária de 5 a 14 anos (DATASUS 2013).

As indicações desta cirurgia são definidas de acordo com a gravidade dos sintomas e as consequências destes para o pacientes. A principal indicação é a hipertrofia tonsilar com grau elevado de obstrução da orofaringe, desencadeando distúrbios respiratórios como a síndrome de apneia obstrutiva do sono e dificuldade de alimentação. Outras indicações podem ser as faringotonsilites recorrentes e halitose por tonsilite caseosa, ambas também promovendo transtornos aos pacientes (Hungria 2000; Stuck et al. 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Uma das principais indicações para a tonsilectomia é a faringotonsilite recorrente e a hipertrofia tonsilar obstrutiva apesar de várias tentativas de cura por antibioticoterapia. Estudos sugerem que a bactéria *S. aureus* seja um dos patógenos mais frequentes na etiologia desta enfermidade. Acredita-se que a bactéria utilize o interior das tonsilas como método de evasão da resposta imune e proteção contra a ação de antimicrobianos (Zautner et al. 2010).

O aumento da frequência de falhas terapêuticas com a penicilina coincide principalmente com a evolução do número de microrganismos produtores de β -lactamases na patogenia das faringotonsilites entre outras possíveis causas, como o início do tratamento precoce com antimicrobianos, resultando na supressão da resposta imune do hospedeiro, redução da microbiota protetora, e podendo reduzir a penetração de antimicrobianos no tecido tonsilar (Pichichero & Casey 2007).

Devido à composição da microbiota ser variada quantitativa e qualitativamente ao longo do tempo para cada criança, a provável colonização do tecido tonsilar por múltiplos patógenos e à inespecificidade das manifestações clínicas, torna-se difícil, porém necessário, o esclarecimento etiológico e a participação do *S. aureus* na doença (Costa et al. 2003; Winn et al. 2006; Swidsinski et al. 2007; Morais et al. 2009; Jensen et al. 2013.).

Evidencia-se portanto, a necessidade de determinação da prevalência de *S. aureus* e de suas características de resistência a antimicrobianos, na realidade da nossa região, na tentativa de se conhecer melhor a patogênese das faringotonsilites favorecendo futuros trabalhos que busquem melhores terapias e redução da indicação da tonsilectomia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de tonsilas extraídas de pacientes atendidos em um hospital escola de Goiânia, Goiás.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar *Staphylococcus aureus* de tonsilas extraídas de pacientes com faringotonsilite recorrente atendidos em um hospital escola;
- Determinar a frequência de *S. aureus* na população de pacientes submetidos à tonsilectomia, bem como o seu perfil de suscetibilidade antimicrobiana;
- Determinar a similaridade genética das cepas identificadas para verificar se há um clone associado à infecção crônica das tonsilas;
- Detectar genes que codificam resistência a antimicrobianos e a produção da leucocidina de Pantón-Valentine.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os sujeitos e/ou responsáveis foram esclarecidos do objetivo do estudo assegurando aos mesmos, sigilo sobre a identificação dos pacientes. Os pacientes foram identificados por um código, o qual apenas os pesquisadores tiveram conhecimento. Os pacientes e, ou responsáveis concordaram e autorizaram o uso da amostra clínica para pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO 1).

O TCLE foi aplicado no momento da consulta médica, na qual o médico responsável optou pela realização de tonsilectomia. No momento da aplicação do TCLE, o responsável pelo paciente ou o próprio paciente, caso fosse maior de idade, foi questionado sobre o tempo de tratamento, o período da primeira tonsilite até o momento da cirurgia, os antimicrobianos usados durante esse período e o número de recidivas.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás sob Protocolo CEP/HC/UFG nº 071/2011 (ANEXO 2).

4.2 AMOSTRAGEM

Este projeto faz parte de um projeto maior e portanto, a coleta de material foi realizada de 15/03/2010 até abril de 2012, de acordo com a demanda espontânea de tonsilectomias do Setor de Clínica Cirúrgica do hospital escola, sendo dois fragmentos de tonsilas por paciente, um de cada lado.

As cirurgias foram realizadas pela equipe de otorrinolaringologia, dentro de sua rotina, ou seja, cerca de cinco cirurgias por semana.

Para a inclusão na amostragem o paciente deveria ter histórico de hipertrofia tonsilar e/ou faringotonsilite de repetição, após falha de tratamento anterior com antimicrobiano, em que o recurso indicado para o tratamento fosse a

tonsilectomia (Conlon et al. 1997; Bhattacharyya et al. 2001). Não foram incluídos indígenas, nem grupos especiais.

As peças cirúrgicas foram divididas pelo médico responsável, imediatamente após a cirurgia, permitindo que o estudo fosse realizado apenas em um pequeno fragmento das tonsilas, não alterando seu destino final que é o exame histopatológico, que foi realizado normalmente no hospital pelo Laboratório de Patologia.

Após a tonsilectomia realizada nos pacientes atendidos no hospital escola, os fragmentos de tonsilas foram encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública em recipiente estéril, para processamento no período máximo de 10 horas após o término da cirurgia. Até o momento do processamento as amostras permaneciam refrigeradas. As amostras não processadas nesse período de tempo foram descartadas.

4.3 PROCESSAMENTO DO ESPÉCIME CLÍNICO

Inicialmente os fragmentos de tonsilas foram pesados (Figura 1). A partir do peso foi determinada a relação de massa e volume e realizada a diluição com água peptonada. As amostras foram transferidas para uma embalagem plástica esterilizada acrescidas de água peptonada tamponada 0,1% na proporção de 1/10, resultando na diluição 10^{-1} .

Posteriormente, o recipiente plástico foi homogeneizado em *stomacher* por dois minutos (Figura 2), do qual foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, sendo esta transferida para tubos Falcon de 15 ml contendo 4,5 mL de água peptonada, o que resultou na diluição 10^{-2} . Esse procedimento foi realizado sucessivamente até a diluição de 10^{-5} .

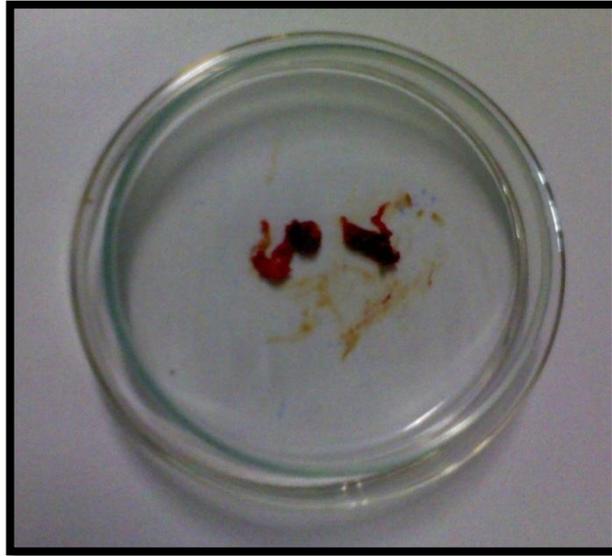


Figura 1: Tonsila recebida no Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

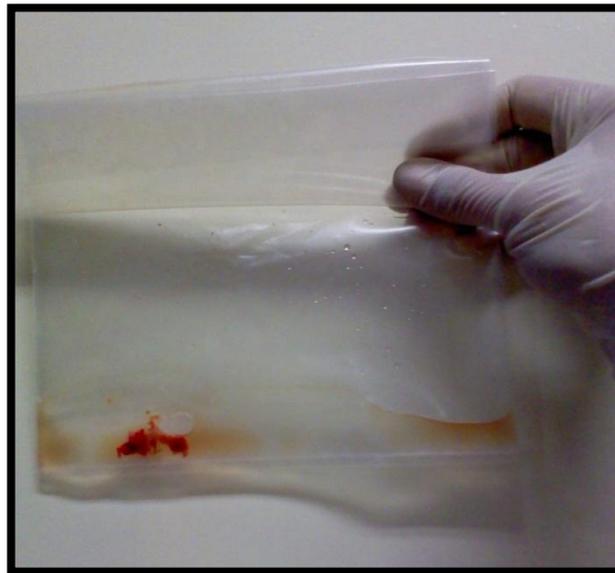


Figura 2: Tonsila macerada na embalagem plástica.

Para o isolamento de *Staphylococcus aureus*, 100 μ L de cada diluição foram inoculados em placas de Petri contendo Ágar Manitol Salgado e incubadas a 35-37°C por 24-48 horas, segundo protocolo específico (Winn et al. 2006).

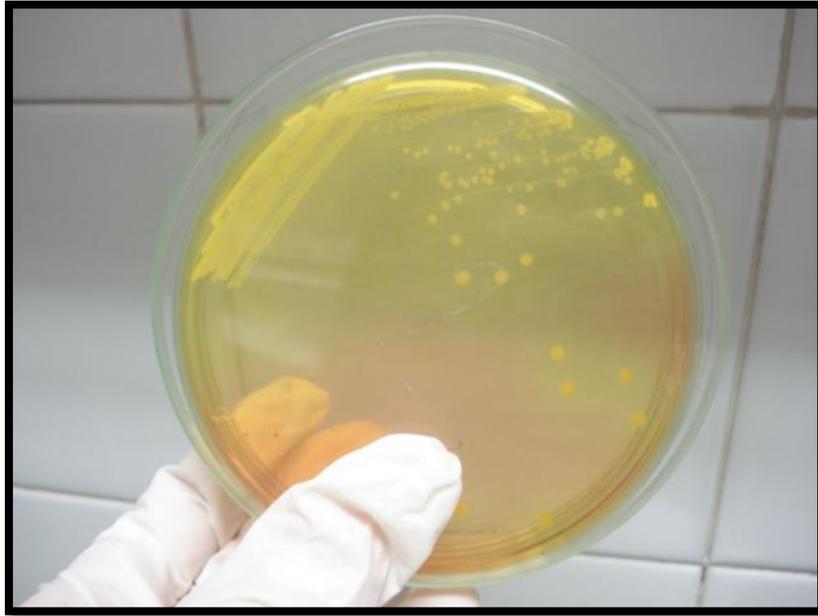


Figura 3: Isolamento de *Staphylococcus sp.* em Ágar Manitol Salgado.

Após este período, foram analisadas, macroscopicamente, colônias de diferentes morfotipos presentes nas placas de Ágar Manitol Salgado (Figura 3). A diluição que permitia melhor isolamento das colônias características de *Staphylococcus sp.* foi escolhida. As colônias desta placa foram repicadas em Ágar TSA (*Trypticase Soy Agar*) acrescido de 5% de sangue de cavalo (Ágar Sangue), para verificação da β -hemólise característica desta espécie, e em Ágar Nutriente, para realização de testes de identificação da espécie, sendo ambas incubadas a 35-37°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada coloração de Gram, identificando cocos gram positivos com arranjos característicos de “cachos de uva”, e testes bioquímicos, classificando as bactérias em *S. aureus* de acordo com os resultados positivos para a produção de catalase, coagulase e DNase, fermentação do manitol e hemólise β (beta) em Ágar Sangue (Figura 4). Os isolados foram congelados a -80°C em meio TSB (*Trypticase Soy Broth*) com glicerol a 20% para posterior caracterização fenotípica e genotípica (Winn et al. 2006).

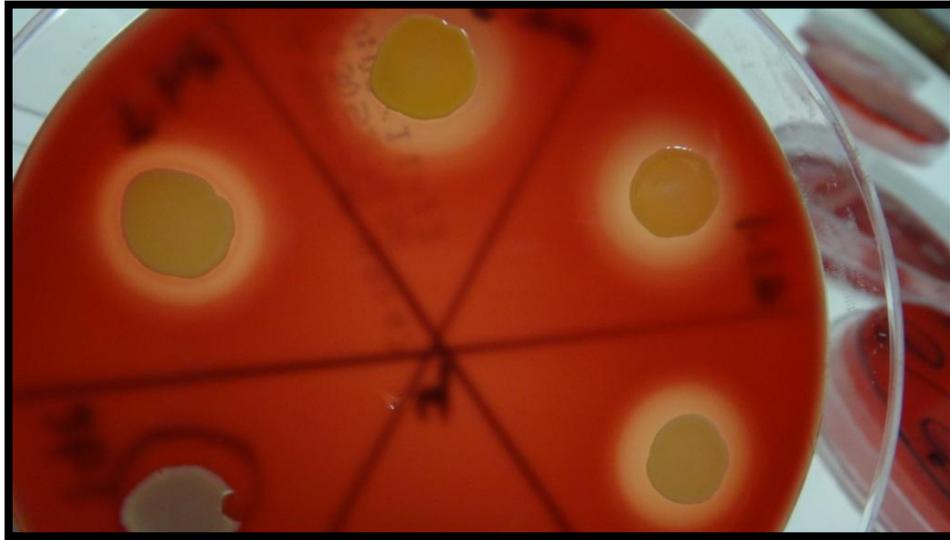


Figura 4: Identificação de *S. aureus* com evidente β -hemólise em Ágar Sangue.

Como este estudo faz parte de um projeto maior, de forma paralela, também foram realizadas análises laboratoriais para isolamento e identificação de outras espécies bacterianas que pudessem estar envolvidas na etiologia das faringotonsilites. Para isso 100 μ L de cada diluição pronta foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar TSA (*Trypticase Soy Ágar*) acrescido de 5% de sangue de cavalo (Ágar Sangue). Após semeadura, as placas foram incubadas em microaerofilia, a 37°C por 72 horas (Winn et al. 2006).

Posteriormente, foram realizadas provas de identificação de acordo com os isolados obtidos, segundo metodologia de Winn et al. (2006).

4.4 SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 Teste de suscetibilidade – Disco Difusão

As amostras armazenadas foram descongeladas e inoculadas em Ágar Nutriente com incubação a 35-37°C por 24h. Quatro ou cinco colônias foram suspensas individualmente em 2 mL de salina a 0,9%, a fim de se obter uma turvação correspondente à metade da turbidez da escala 1,0 de McFarland (3 $\times 10^8$ UFC/mL), ou seja, 1,5 $\times 10^8$ UFC/mL, utilizando espectrofotômetro com absorvância variando de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625

nm. Após a homogeneização do inóculo, foi feita a inoculação com swab estéril em toda a superfície do Ágar Müller-Hinton e os discos de antimicrobianos foram distribuídos na superfície (Bauer et al. 1966). Foram testados os seguintes antimicrobianos: penicilina (10 UI), cefoxitina (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), quinopristina+dalfopristina (15 µg), linezolida (30 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25 mcg), amoxicilina + ácido clavulânico (30 mcg), ciprofloxacina (5 µg), ceftriaxona (30 mcg), tetraciclina (30 µg) e rifampicina (5 µg). O controle de qualidade foi realizado com as cepas de *S. aureus* ATCC 25923. As placas foram então incubadas a 35-37°C por 18-24 horas e a leitura dos halos de inibição realizada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI 2013).

Nas placas de antibiograma foi também realizado o teste D ou teste de indução para identificação do padrão de resistência MLSb (induzível ou constitutivo), utilizando os antimicrobianos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas, ou seja, eritromicina, clindamicina e quinupristina/dalfopristina, respectivamente. Os discos desses respectivos antimicrobianos foram colocados a uma distância de 15 mm centro a centro. Após incubação, um achatamento do halo de inibição (formato de 'D') indicava resistência induzível à clindamicina e quinupristina/dalfopristina, determinando o perfil MLSb induzível (Figura 5). Caso fosse observado resistência aos três antimicrobianos, o perfil MLSb seria classificado em constitutivo (Winn et al. 2006).

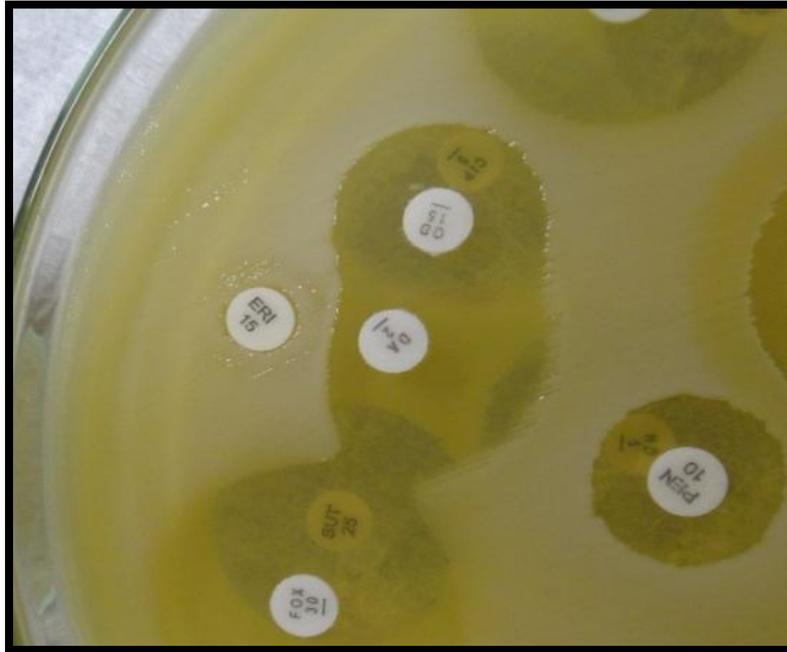


Figura 5: Verificação do achatamento do halo de inibição indicando resistência induzível à clindamicina.

4.4.2 Concentração Inibitória Mínima - CIM - E-test[®]

Para os isolados de *S.aureus* que apresentaram resistência à cefoxitina realizamos o E-test[®] para determinar a CIM para oxacilina e confirmar a resistência. Semelhante à metodologia anterior de disco difusão, com auxílio do espectrofotômetro, os inóculos foram preparados na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, e feita a inoculação com swab estéril em toda a superfície do Ágar Müller-Hinton. Sobre a superfície do Ágar foi colocado uma fita com uma escala de concentração em $\mu\text{g/mL}$, impregnada com oxacilina (Biomérieux[®]) (Figura 6). As placas foram incubadas a 35-37°C por 18-24 horas. Após o período de incubação, os isolados de *S. aureus* que apresentaram CIM $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ foram classificados como resistentes à oxacilina, portanto, resistentes à meticilina - MRSA. Os isolados que apresentaram CIM $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ foram classificados em sensíveis à oxacilina e portanto MSSA (Winn et al. 2006).

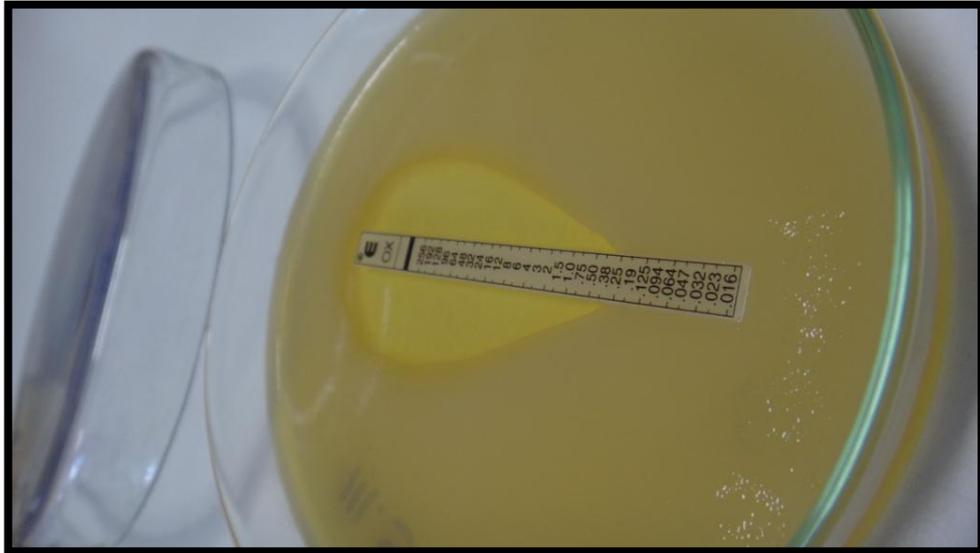


Figura 6: Técnica de E-test[®] para verificação de resistência à oxacilina.

4.5 DETECÇÃO MOLECULAR DE GENES DE VIRULÊNCIA

Os isolados resistentes à cefoxitina foram submetidos à detecção do gene *mecA* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Da mesma forma, todos os isolados foram submetidos à detecção do gene que codifica a produção da leucocidina de Panton-Valentine.

4.5.1 Extração do DNA bacteriano

As amostras foram descongeladas e inoculadas em placas de TSA sendo incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, três a quatro colônias foram suspensas em 50 µL de solução tampão TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) com 1 µL de lisostafina (10 mg/mL) e incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, para o processo de desnaturação, a suspensão foi reincubada em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Adicionou-se 150 µL de H₂O MiliQ autoclavada e a suspensão foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado como DNA *template* para a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para essa extração utilizou-se o protocolo estabelecido por Aires de Sousa et al. (2007) com modificações.

4.5.2 PCR para detecção do gene *mecA*

A detecção do gene *mecA* seguiu o protocolo estabelecido por Murakami et al. (1991) com modificações. A mistura da reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂); 80 µM de cada dNTP; 0,25 µM de cada *primer* (5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3' e 5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'); 1 U de Taq DNA polimerase e 20 ng do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Axygen[®]) seguindo o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 4 minutos a 72°C. Após a amplificação realizamos a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X por 30 minutos a 120V. Foi utilizado o marcador molecular de 1 Kb plus como padrão de peso molecular, as cepas de *S. aureus* USA 300 e clone Pediátrico como controles positivos e a mistura da reação sem a bactéria como controle negativo. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e visualizados sob luz UV em transiluminador e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad). para análise posterior.

4.5.3 PCR para detecção do gene que codifica a Leucocidina de Panton-Valentine

Para a identificação por PCR dos genes responsáveis pela codificação da leucocidina de Panton Valentine, *lukS-PV* e *lukF-PV*, utilizamos *primers* sintetizados a partir de sequências de DNA genômico depositadas no banco de dados GenBank (número de acesso GenBank AB006796) (Lina et al. 1999). A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂); 80 µM de cada dNTP; 0,25 µM de cada *primer* (*luk-PV-1*: 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3' e *luk-PV-2*: 5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC-3'); 1 U de TaqDNA polimerase; 20 ng do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador (Axygen[®]) seguindo o programa: 5 minutos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a

94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação realizamos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X por 1 hora a 120V. Utilizamos marcador molecular de 50 pb (Invitrogen®) como padrão de peso molecular, a cepa de *S. aureus* OSPC (*Oceania Southwest Pacific Clone*) como controle positivo e a mistura da reação sem o DNA bacteriano como controle negativo. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e visualizados sob luz UV em transiluminador e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad). para análise posterior.

4.6 ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSADO (*PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS* -PFGE)

O perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico dos isolados de *S. aureus* foi determinado pela técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE) após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *Sma*I (Chung et al. 2000). Após cultivo dos isolados de *S. aureus* em TSB e incubação a 37°C por 18-24 horas, as células tiveram sua concentração ajustada em tampão Tris-NaCl (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 1M) em espectrofotômetro pelo cálculo da OD 620_{nm} ($V \text{ add } (\mu\text{L}) = \text{OD} \times 40 \times 210 - 210$).

A suspensão celular ajustada foi homogeneizada com 100 µL de gel de agarose LMP (*Low Melting Point* agarose, Invitrogen®) 1,5% para formação de pequenos blocos de agarose (*plugs*). As células bacterianas contidas nos *plugs* foram lisadas por cinco horas em solução EC (Tris 6mM pH 8,0; NaCl 1M; EDTA 0,1 M pH 8,0; desoxicolato de sódio 0,2% e sódio lauril sarcosina 0,5%) acrescida de uma solução de lise composta por lisozima (100 µL/mL – Sigma®), lisostafina (50 µL/mL – Sigma®) e RNase (50 µL/mL – Sigma®). Após esse período, foi realizada a desproteínização em solução ES (EDTA 0,5 M, pH 9,0 e sódio laurilsarcosina 1%) com Proteinase K (1 mg/mL) (Invitrogen®) por um período mínimo de 17 horas a 50°C. Após a incubação, os blocos de gel foram lavados (5 lavagens com incubações de 30 minutos cada) com a solução tampão Tris-EDTA

(Tris 10 mM pH 7,5 e EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

4.6.1 Condições de digestão e eletroforese

Para cada isolado, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com a enzima de restrição e condições de corrida seguintes: 20U da enzima de restrição *Sma*I em 100µL de tampão 1X por pelo menos 6 horas a temperatura ambiente. Eletroforese: corrente alternando com intervalos de pulso de 5 a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14°C por 22 horas.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose de corrida a 1% em solução tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) no sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (1µg/mL) por uma hora, descorados em H₂O/15' e visualizados sob luz UV em transiluminador e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad). As fotos foram digitalizadas para análise posterior.

A análise do perfil dos fragmentos de macrorrestrição resultantes foi inicialmente realizada por inspeção visual segundo os critérios sistematizados por Tenover et al. (1995): (i) **cepas geneticamente indistinguíveis**, quando as cepas apresentarem perfil de restrição com o mesmo número de bandas e correspondência de tamanho entre elas; (ii) **cepas estritamente relacionadas**, quando as cepas diferirem em duas a três bandas nos perfis de restrição; (iii) **cepas possivelmente relacionadas**, quando as cepas diferirem em quatro a seis bandas nos perfis de restrição e (iv) **cepas não relacionadas**, quando as cepas diferirem em sete ou mais bandas nos perfis de restrição.

Adicionalmente, os géis de PFGE foram utilizados como imagens preto e branco invertidas de oito bits e processados pelo programa BioNumerics (versão 5.0; *AppliedMaths, Ghent, Belgium*).

Para a normalização e padronização utilizamos como referência a cepa *S. aureus* NCTC 8325, que produz bandas visíveis entre 674 kb e 9 kb. Para cada amostra analisada as bandas situadas acima da maior banda (674 kb) e abaixo da menor banda (9 kb) da NCTC foram excluídas da análise. Na construção do

dendrograma, utilizamos o coeficiente de similaridade de Dice (Dice 1945), baseado na posição e presença das bandas e no algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair – Groups Method with Arithmetic Mean*) através de agrupamentos por médias não ponderadas (Sneath & Sokal 1973). Para o agrupamento em *cluster* definimos perfis ($n \geq 2$) apresentando um coeficiente de similaridade acima de 80% (Carriço et al. 2005). Os parâmetros de otimização e tolerância utilizados foram respectivamente 0,7 e 1,0%.

4.7 BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando-se o programa Excel (Microsoft Office 2007) foi montado um banco dos dados obtidos através das fichas com aspectos demográficos, bem como os resultados microbiológicos (espécime clínico, microrganismo isolado e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos).

A análise das variáveis, sexo e idade pelo teste T de Student, com nível de significância fixado em 0,05 ($p < 0,05$), foi realizada utilizando-se os programas estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 (SPSS, Chicago) e o Epi Info Software versão 2000 (CDC, Atlanta).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período do estudo, de março de 2010 a abril de 2012, foram processadas 123 tonsilas no Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás. A Tabela 1 mostra a variação de idade e sexo entre os pacientes avaliados. Nela podemos observar que a média de idade dos pacientes esteve de acordo com a literatura, em que se observa que a faringotonsilite bacteriana é uma infecção que acomete principalmente crianças e adolescentes entre 5 e 15 anos de idade (Bisno et al. 2002; Stuck et al. 2008).

Tabela 1: Prevalência de tonsilectomia por sexo e idade em pacientes atendidos em hospital escola de Goiânia, Goiás, 2012.

Sexo	N/%	Média de idade	Desvio padrão
Masculino	66/53,7	7,9	4,6749
Feminino	57/46,3	15,1	12,7924
Total	123/100	11,3	9,9854

A média de idade dos pacientes submetidos à tonsilectomia foi de 11,3 anos, sendo que 66 (53,7%) eram do sexo masculino e 57 (46,3%) do sexo feminino, sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Dados que concordam com Costa et al. (2003) que observaram entre 90 crianças, 64,4% do sexo masculino e 35,6% do sexo feminino e com Júnior et al. (2008), que verificaram, em Santo Amaro, porcentagens de 45,3% de pacientes do sexo masculino e 54,7% do sexo feminino submetidos à tonsilectomia. Entre os grupos, a média de idade dos pacientes do sexo masculino submetidos à tonsilectomia foi menor (7,9 anos) ($p < 0,05$) do que a média de idade das pacientes (15,1 anos). A faringotonsilite de repetição foi relatada em 75,5% dos pacientes, mostrando sua importância para a indicação da tonsilectomia. Glover (2008) mostrou que, na maioria dos estudos, os meninos são mais operados do que as meninas e que a faixa etária onde se verifica mais cirurgias é de 5 a 7 anos. Neste período da

infância verifica-se mudanças na microbiota da cavidade oral, proporcionadas pelos vários contatos em casa e nas escolas, sendo que a tonsila tende a atrofiar com a puberdade (Hungria 2000).

Das 123 amostras analisadas foram obtidos 373 isolados (Tabela 2), sendo que *S. aureus* representou 16,1% do total e mostrou-se superior aos *Streptococcus* β -hemolíticos (5,6%). Podemos observar que a prevalência de *S. aureus* foi maior do que os outros microrganismos identificados, com exceção dos *Streptococcus* do grupo *viridans* que fazem parte da microbiota oral. Considerando que no momento da cirurgia de tonsilectomia os pacientes não estavam apresentando processo inflamatório agudo, a prevalência de *S. aureus* encontrada remete à manutenção da bactéria nas tonsilas após o processo inflamatório e após o tratamento com antimicrobianos, juntamente com a microbiota colonizadora da boca, representada pelos *Streptococcus* do grupo *viridans* (32,8%). Raju & Selvam (2012) também observaram no estudo em Chennai, Índia, com crianças apresentando tonsilite crônica, alta prevalência de *S. aureus* juntamente com a microbiota oral.

Tabela 2: Prevalência de microrganismos isolados de 123 pacientes submetidos à tonsilectomia em hospital escola de Goiânia, Goiás, 2012.

Microrganismos isolados	Quantidade (%)
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>viridans</i> (alfa e não hemolítico)	123 (33,0%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	60 (16,1%)
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	33 (8,9%)
<i>Enterococcus</i>	23 (6,2%)
<i>Corynebacterium</i> spp.	22 (5,9%)
<i>Streptococcus</i> β -hemolíticos	21 (5,6%)
<i>Streptobacillus</i> sp.	18 (4,8%)
<i>Micrococcus</i>	17 (4,6%)
<i>Streptococcus</i> sp.	09 (2,4%)
Outros	47 (12,6%)
TOTAL	373 (100%)

Das 123 tonsilas avaliadas, *Staphylococcus aureus* foram isolados em 49 (39,8%) pacientes (Tabela 3).

Tabela 3: Prevalência de *S. aureus* por sexo e idade em pacientes atendidos em hospital escola de Goiânia, Goiás, 2012.

Sexo	N/%	Média de idade	Desvio padrão
Masculino	29/59,2	8,234	4,9362
Feminino	20/40,8	15,250	11,1160
Total	49/100	11,098	8,6754

Não foi observada diferença de prevalência de *S. aureus* em relação ao sexo dos pacientes como verificado em outros estudos onde o isolamento de *S. aureus* predominou no sexo feminino (Zautner et al. 2010). Na comparação entre as médias de idade, o sexo feminino apresentou média de 15,3 anos, maior que a do sexo masculino (8,2 anos) ($p < 0,05$). Zautner et al. (2010), na Alemanha, também observaram que a infecção recorrente das tonsilas esteve mais presente entre crianças e adolescentes, o que foi evidente também em estudo realizado por Raju & Selvam (2012) em Chennai, Índia.

Nos 49 pacientes avaliados identificamos frequência de 77,6% de faringotonsilite de repetição e 89,8% de hipertrofia tonsilar, sendo os graus de obstrução III e IV os mais encontrados. O que está de acordo com a literatura, sendo a faringotonsilite recorrente e, ou a hipertrofia tonsilar, com quadro clínico completo da apnéia do sono apresentando roncos noturnos e pausas respiratórias, as principais indicações para a realização da tonsilectomia (Hungria 2000; Discolo et al. 2003; Stuck et al. 2008).

A região da garganta é considerada um local de colonização por *S. aureus* além da região anterior das narinas, sítio de colonização primário de *S. aureus* (Lowy 1998; Nilsson & Ripa 2006; Mertz et al. 2007; Sollid et al. 2013). Possivelmente a tonsila seja uma região colonizada por esta bactéria. Nilsson & Ripa (2006) observaram que o sítio mais comum de isolamento de *S. aureus* foi a garganta (40,0% dos pacientes) seguido das narinas anteriores (31,0% dos pacientes). Mertz et al. (2007) reconheceram que a garganta também representa

um sítio de colonização de *S. aureus* e, portanto pode transmitir cepas desta bactéria pela comunidade e pelo ambiente hospitalar. Seu trabalho sugere considerar a garganta como um local de colonização de *S. aureus* além das narinas para a implantação de programas rotineiros de controle da disseminação de cepas resistentes, principalmente MRSA.

O aumento da prevalência de *S. aureus* como o principal agente da infecção da tonsila ou como um provável copatógeno ao longo dos anos vem sendo relatado por vários autores (Costa et al. 2003; Pereira et al. 2008, Zautner et al. 2010; Raju & Selvam 2012). Em estudo realizado em Chennai, Índia, o *S. aureus* representou 83,0% das bactérias patogênicas identificadas em crianças e adolescentes com tonsilites crônicas (Raju & Selvam 2012). Na Alemanha 57,7% de 130 pacientes com tonsilite de repetição, submetidos à tonsilectomia, apresentaram o *S. aureus* como o patógeno mais prevalente em crianças e adultos (Zautner et al. 2010), resultado superior ao nosso estudo, em que observamos 16,1%. Um quinto dos pacientes dos quais foi isolado o *S. aureus*, o tiveram como o único agente patogênico. No presente estudo encontramos seis (12,2%) pacientes nos quais o *S. aureus* foi o único agente encontrado.

A evolução na prevalência do *S. aureus* foi relatada também no estudo realizado por Timon et al. (1990), em Dublin, Irlanda, no qual comparamos microrganismos isolados de tonsilas provenientes de pacientes com história de tonsilite crônica e submetidos à tonsilectomia, em dois períodos (1980 e 1989). No primeiro período houve uma predominância de *Haemophilus influenzae* no tecido tonsilar, observando na superfície uma evidente microbiota normal. Já no segundo período observou-se um aumento da prevalência de *S. aureus* nas tonsilas com variação de 6,0% no ano de 1980 para 40,0% em 1989. O trabalho também observou que 6,0% do total das tonsilas analisadas em 1980 apresentavam mais de um microrganismo, diferenciando de 1989 que teve uma porcentagem significativamente maior, 52,0%. Esse dado suporta a teoria de copatogenicidade e alteração da microbiota, sugerindo uma etiologia polimicrobiana, o que se observa também neste estudo pela grande quantidade de bactérias identificadas.

A alta prevalência de *S. aureus* também foi observada em Ulm, Alemanha, onde 45,0% dos pacientes analisados com faringotonsilites

recorrentes/hipertróficas eram carreadores de *Staphylococcus aureus* (Podbielski et al. 2003). Pereira et al. (2008), em um estudo realizado em dois institutos do setor público e em uma creche de Trinidad, investigaram a prevalência de microrganismos aeróbios na superfície e no tecido das tonsilas de crianças com tonsilites de repetição e/ou com sintomas de apneia do sono, após cirurgia de tonsilectomia. De 360 amostras da superfície e do tecido tonsilar, conseguiu-se obter um total de 800 isolados aeróbios. Desses 800 isolados, 410 (51,3%), 338 (42,3%) e 52 (6,4%) foram respectivos para *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e outras bactérias.

A predominância de *S. aureus* também foi evidente no trabalho de Hirakata et al. (2005) em Nagasaki, Japão, onde examinaram, em 29 clínicas e 16 hospitais, pacientes com sintomas típicos de tonsilites, como dores de garganta, presença de exsudato purulento, *caseum* e eritema, evidenciando a prevalência de 26,0% deste agente, representando o principal patógeno isolado, seguido de *H. influenzae* (17,6%), *M. catarrhalis* (7,4%), *S. pyogenes* (6,8%) e *S. pneumoniae* (5,3%). Em Marbella, Espanha, Maroto et al. (2006), verificaram também o *Staphylococcus aureus* (29,3%) como o principal agente da tonsilite recorrente, seguido de *Streptococcus pyogenes* (23,4%) e de *Haemophilus influenzae* (12,1%).

A evolução do *S. aureus* nas infecções tonsilares e sua permanência no tecido tonsilar mesmo após o processo inflamatório, pode estar relacionado com a sua capacidade de formação de biofilme. Essa associação já foi observada em um estudo realizado em Milão, Itália, com pacientes entre três e treze anos com tonsilites recorrentes, e evidenciaram que a prevalência de 81,8% de *S. aureus* em tonsilites recorrentes foi atribuída à formação de biofilme (Torretta et al. 2013). Já outros autores atribuíram a presença do *S. aureus* em tonsilites recorrentes à sua capacidade de internalização no tecido tonsilar (Zautner et al. 2010).

As infecções crônicas relacionadas com a formação de biofilme são frequentes na especialidade de otorrinolaringologia (Al-Mazrou & Al-Khattaf 2008; Mena Viveros 2012). A presença do biofilme pode explicar as falhas terapêuticas e, portanto a reincidência da infecção e representar um elemento importante na manutenção do estado crônico, mesmo na ausência de um processo inflamatório agudo (Chole & Faddis 2003; Conley et al. 2003; Torretta et al. 2013).

A identificação do *S. aureus* torna-se ainda mais importante quando avaliamos a sua suscetibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na clínica médica. Observamos que em nove (18,4%) dos 49 pacientes houve a identificação de dois ou mais isolados de *S. aureus* e que esses isolados apresentaram perfis de suscetibilidade diferentes.

De acordo com o antibiograma (Tabela 4) os isolados apresentaram maior resistência à penicilina (85,0%) seguida de ciprofloxacina (18,3%) e cefoxitina (15,0%). Seis isolados (10,0%) que apresentaram resistência à eritromicina também mostraram fenótipo MLSb induzível, portanto resistência à clindamicina e a quinupristina/dalfopristina (CLSI 2013). Todos os isolados foram sensíveis à linezolida e à rifampicina.

Tabela 4: Perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com faringotonsilites de repetição submetidos à tonsilectomia, 2012.

Antimicrobiano	Resistência Nº (%)
Penicilina	51 (85,0)
Amoxicilina + ácido clavulânico	6 (10,0)
Cefoxitina	9 (15,0)
Ceftriaxona	2 (3,3)
Eritromicina	6 (10,0)
Clindamicina	6 (10,0)
Quinupristina/Dalfopristina	6 (10,0)
Sulfametoxazol/Trimetoprima	2 (3,3)
Linezolida	0 (0)
Rifampicina	0 (0)
Ciprofloxacina	11 (18,3)
Tetraciclina	5 (8,3)

Neste estudo, 79,6% (39) dos pacientes declararam ter utilizado antimicrobianos anteriormente à realização da tonsilectomia. Dos pacientes que referiram ter tratado infecções respiratórias nos 30 dias anteriores, 59,0% utilizaram antimicrobianos. A utilização de antimicrobianos em excesso e

indiscriminadamente possibilita a emergência de cepas resistentes e dificulta o tratamento das infecções (Sih & Bricks 2008; Stuck et al. 2008). Segundo um questionamento aos médicos da atenção primária da Espanha, Ripoll et al. (2002) relataram que a tonsilite representa o motivo mais frequente de prescrição de antimicrobianos (18,8%).

Em nosso estudo, vinte e dois pacientes (44,9%) declararam ter utilizado a amoxicilina como a principal droga de escolha para o tratamento das faringotonsilites. A utilização de penicilina G e associação de amoxicilina + ácido clavulânico foram declaradas como segundas opções de tratamento. Esses dados corroboram com os dados obtidos no estudo apresentado por Ripoll et al. (2002), onde a penicilina foi observada como primeira opção de tratamento das tonsilites e a associação de amoxicilina + ácido clavulânico como segunda opção. Pereira et al. (2008) relataram, no estudo em Trinidad com crianças e adolescentes (≤ 16 anos) com indicação de tonsilectomia devido às tonsilites de repetição e/ou hipertrofia, 52,2% de uso de amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e macrolídeos. Em um estudo transversal de base populacional no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, o uso da amoxicilina foi relatado como o principal antimicrobiano em infecções respiratórias (19,5% de todos os medicamentos mencionados), seguida pelo uso de sulfametoxazol- trimetoprima (17,8%) (Berquó et al. 2004).

Morais et al. (2009) também mostraram a amoxicilina como a principal droga de escolha em crianças que recorriam ao serviço de urgência em um hospital de Portugal, apresentando ao exame clínico sinais de inflamação faringotonsilar. A amoxicilina representou 90,0%, seguida dos macrolídeos (4,0%), amoxicilina + ácido clavulânico (4,0%) e cefalosporina (2,0%).

Sendo a amoxicilina a principal droga utilizada no tratamento das faringotonsilites, considera-se a presença de copatógenos, como o *S. aureus*, uma justificativa às constantes falhas no tratamento das faringotonsilites com as penicilinas (Brook & Gober 2008), como observado em nosso estudo, no qual identificamos 85,0% de isolados resistentes à penicilina. Os *S. aureus* como produtores de β -lactamases interferem na ação dos antimicrobianos β -lactâmicos (Casey & Pichichero 2007; Brook 2013). Portanto, as falhas no uso da penicilina desencadearam um aumento na utilização de outros antimicrobianos como as

associações com os inibidores de β -lactamases (Brook 2007a) e as cefalosporinas (Brook 2007b; Casey & Pichichero 2007; Brook & Gober 2009; Drawz & Bonomo 2010).

Encontramos resistência de 85,0% à penicilina em contraste com apenas 10,0% de resistência à associação de amoxicilina + ácido clavulânico. Este resultado sugere que os isolados possivelmente eram produtores da enzima β -lactamase e que estas sofreram ação do inibidor de β -lactamase. Em um estudo no México com 394 pacientes com faringotonsilite, foi demonstrado que em 35,0% dos pacientes com *Streptococcus pyogenes* houve isolamento de pelo menos uma bactéria produtora de β -lactamase, sendo o *S. aureus* o mais frequente, representando 82,0% dos isolados, apresentando 100% de resistência à penicilina e ampicilina (Avilés & Zaragoza 2000).

A evidência de elevada resistência a penicilina é comumente encontrada não somente nos isolados em ambiente hospitalar, como também na comunidade (Chambers 2001). Considerar a crescente prevalência de *S. aureus* nas faringotonsilites e seu perfil de suscetibilidade às drogas pode oferecer aos pacientes um tratamento correto e assim uma melhor qualidade de vida.

Uma das preocupações em relação aos perfis de resistência dos *S. aureus*, além do fato de interferirem no tratamento pela produção de β -lactamases, é a emergência de cepas MRSA, tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar (Winn et al. 2006; Huang et al. 2007).

Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, segundo o CLSI (2013), a cefoxitina é utilizada para prever a resistência à oxacilina mediada pela expressão do gene *mecA*. Em nosso estudo evidenciamos 15,0% (9) dos isolados resistentes à cefoxitina. Porém, quando submetidos ao E-test[®], nenhum dos nove isolados resistentes à cefoxitina apresentaram CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. Foi realizada então a PCR para detecção do gene *mecA*, onde dois isolados mostraram-se positivos (Figura 7). A presença do gene *mecA* identificado por PCR é a técnica confirmatória para identificação de MRSA (Cuirolo et al. 2011; Almeida et al. 2012), portanto consideramos MRSA apenas dois isolados (3,3%). Este resultado é semelhante ao obtido por Zautner et al. (2010) que evidenciaram o isolamento de MRSA em apenas um de 76 isolados de pacientes com tonsilite recorrente na Alemanha. No Japão, Hirakata et al. (2005) identificaram 9,1% de isolados MRSA em pacientes

com sintomas de faringotonsilite e nos EUA Brook & Foote (2006), encontraram 16,0% de MRSA em tonsilas de pacientes submetidos à tonsilectomia devido à tonsilite recorrente.

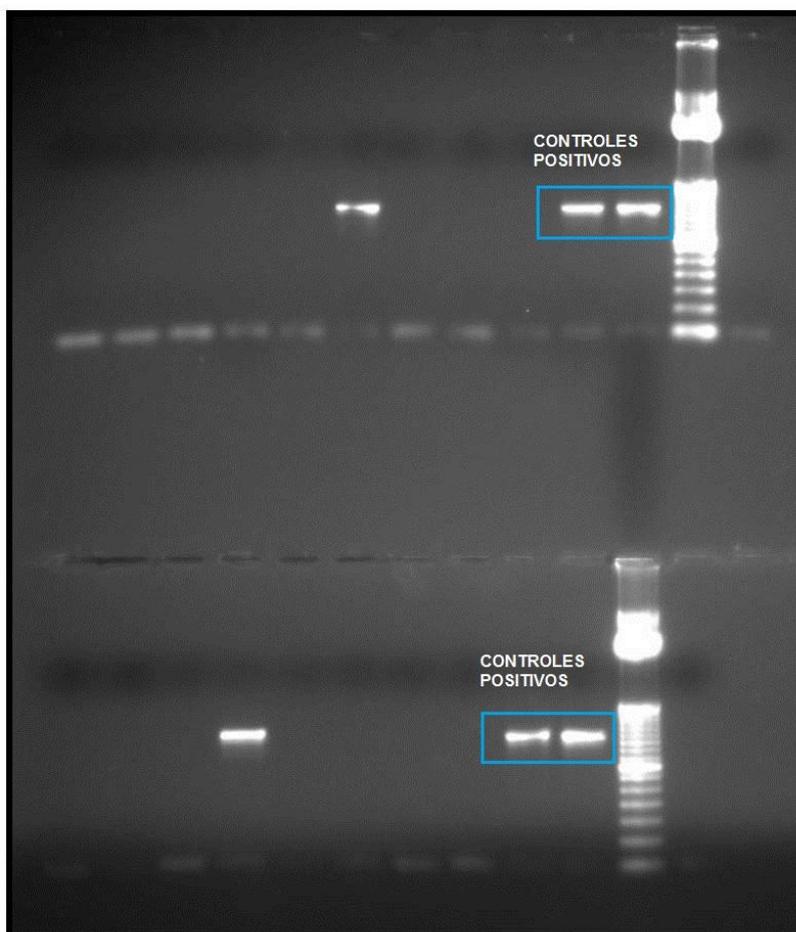


Figura 7: PCR evidenciando duas cepas com o gene *mecA*.

Cepas com CIM ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ para oxacilina e positivas para o gene *mecA* já foram relatadas por alguns autores (Petinaki et al. 2002; Chen et al. 2009; Kumar et al. 2013). A expressão do gene *mecA* é heterogênea em muitas cepas, podendo haver baixo nível de expressão de resistência à oxacilina em algumas cepas de *S. aureus* (Chambers et al. 1989; Witte et al. 2007). A presença de um β -lactâmico no ambiente pode aumentar a expressão do gene, porém há diferenças entre os componentes da classe dos β -lactâmicos (Mckinney et al. 2001). Reconhece-se a maior eficiência de outras drogas, como a cefoxitina, como indutor de expressão do gene *mecA* dentre os β -lactâmicos (Mckinney et al. 2001; Pottumarthy et al. 2005), indicando, portanto, que possivelmente na técnica

de disco-difusão a cefoxitina foi capaz de induzir a expressão do gene *mecA* nas duas cepas *mecA*-positivas, o que não foi evidente no E-test[®] onde o agente indutor foi a oxacilina (CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$). A literatura estabelece a utilização da cefoxitina para identificação de cepas MRSA, com evidente halo de inibição ≥ 21 mm (Pottumarthy et al. 2005; Swenson et al. 2007; Kaiser et al. 2010; CLSI 2013), porém encontramos sete isolados (11,5%) resistentes à cefoxitina pela técnica de disco-difusão que não apresentaram o gene *mecA*. Apesar de contraditório, algumas hipóteses tentam explicar esse fenômeno.

A resistência à meticilina pode ser observada em isolados negativos para o gene *mecA* devido à modificação de genes que codificam PBP normais ou da superprodução de β -lactamases pelos *S. aureus* (Chambers 1997).

Mutações nos genes que codificam as PBPs podem gerar modificações estruturais que alteram a ligação dessas aos β -lactâmicos, diminuindo a sua afinidade e determinando resistência aos antimicrobianos (Tomasz et al. 1989; Banerjee et al. 2008; Banerjee et al. 2010). Mutações também podem levar à hiperexpressão de PBPs e produzir um pequeno, mas considerável aumento na resistência aos β -lactâmicos (Henze & Berger-Bachi 1996). Essas mutações podem ser geradas pela pressão seletiva direta exercida graças ao uso excessivo de β -lactâmicos (Hackbarth et al. 1995).

Além das alterações de PBPs, o *S. aureus* pode desenvolver resistência aos β -lactâmicos por hiperprodução de β -lactamases (Chambers 1997; Almeida et al. 2012). Estudo de McDougal & Thornsberry (1986) mostra que *S. aureus* capazes de produzir β -lactamases em grande quantidade são capazes de inativar de forma mais lenta as penicilinas resistentes às penicilinases. Em nosso estudo, provavelmente a produção de β -lactamase, se em grande quantidade, pode ter influenciado no teste com o disco de cefoxitina e estabelecido resistência fenotipicamente.

Outra possibilidade é a existência de um gene homólogo ao gene *mecA*, o gene *mecA* LGA251, ou como nomeado gene *mecC*, tendo 63% de homologia em nível de aminoácidos e 70% em nível de DNA com o gene *mecA* codificador da proteína PBP2a (García-Álvarez et al. 2011; Ito et al. 2012). Até agora, os isolados contendo *mecA* LGA251 mostraram resistência fenotípica aos β -lactâmicos, mas não são reconhecidos nas PCRs convencionais para o gene

mecA (CLSI 2013). Stegger et al. (2012) identificaram cepas de *S. aureus* resistentes à cefoxitina e que não apresentavam o gene *mecA*, porém carream o gene *mecA* LGA251. Cartwright et al. (2013) também verificaram resistência à cefoxitina devido à presença do gene *mecC*, sendo que 88,7% das cepas analisadas apresentaram perfil de resistência à cefoxitina e suscetibilidade à oxacilina, 11,3% apresentaram resistência aos dois antimicrobianos e nenhuma cepa foi resistente somente à oxacilina. Uma explicação para esse fenômeno seria a codificação de uma PBP2a pelo gene *mecC* com uma afinidade relativamente alta à oxacilina mas com afinidade baixa à cefoxitina (Kim et al. 2012).

Encontramos neste estudo 18,3% de resistência à ciprofloxacina, uma quinolona de segunda geração. As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, possuem atividade limitada contra faringotonsilites, não sendo indicadas como alternativa para o tratamento (Grossman 1997). Mesmo possuindo uma boa penetração no tecido tonsilar (Falser et al. 1988), a maior limitação do uso das fluoroquinolonas é a facilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana (Chambers 1997; Lowy 2003; Alós 2009). O aumento de resistência às fluoroquinolonas tem sido observado (Acar & Goldstein 1997). O uso crescente de antimicrobianos possivelmente proporcionou uma pressão seletiva para essa resistência. Pequenas mutações cromossomais podem ser suficientes para conferir resistência. O primeiro alvo das fluoroquinolonas em *Staphylococcus* sp. é a Topoisomerase IV, e a DNA girase é o segundo alvo, sendo que uma mutação nos genes que as codificam pode produzir níveis de resistência clinicamente significantes (Lowy 2003).

Foi detectado neste estudo a presença de seis (10,0%) isolados resistentes à eritromicina apresentando resistência induzível à clindamicina e à quinupristina/dalfopristina (fenótipo D - MLSb induzível). Não verificamos nenhum isolado com perfil de resistência MLSb constitutiva. O perfil de resistência MLSb é mediado pela presença do gene *erm* que produz modificação no sítio de ligação da droga no RNAr e possibilita falhas terapêuticas e recidivas (Lewis & Jorgensen 2005). Portanto, deve-se considerar a presença dessa característica de resistência no momento da realização dos testes laboratoriais, sendo uma informação necessária para o correto tratamento do paciente que possa

apresentar isolados com fenótipo MLSb induzível. Devido à alta porcentagem (90,0%) de sensibilidade à clindamicina, mesmo na presença de um indutor de resistência como a eritromicina, conclui-se que a clindamicina ainda pode ser considerada uma alternativa para o tratamento da faringotonsilite de repetição, tendo, no entanto, a necessidade da realização do teste fenotípico no diagnóstico laboratorial para a verificação desse perfil de resistência MLSb induzível ou constitutivo. Uma restrição desnecessária ao uso de lincosaminas devido aos vários relatos de resistência MLSb pode levar à utilização inapropriada e desnecessária de glicopeptídeos, como a vancomicina (Cetin et al. 2010). Além de que o desconhecimento da resistência induzida à clindamicina e a utilização desta droga no tratamento das infecções pode levar ao risco de seleção de mutantes constitutivos (Drinkovic et al. 2001; Leclercq 2002).

Foi realizada uma avaliação dos perfis fenotípicos obtidos em nosso estudo. Na tabela 5 observamos que do total de 60 isolados de *S. aureus*, apenas 7 (11,7%) foram suscetíveis à todas as drogas testadas. O restante, 53 (88,3%), apresentou 15 diferentes perfis de suscetibilidade, evidenciando uma grande diversidade de fenótipos. Verificou-se que 58,3% (35) dos isolados apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antimicrobiano; 16,7% (10) dos isolados foram resistentes a duas classes, 3,3% (02) resistentes a três, 6,7% (04) foram resistentes a quatro e 3,3% (02) resistentes a cinco classes de antimicrobianos.

Observamos ainda que os dois isolados que apresentaram o gene *mecA* (MRSA) apresentaram perfis de suscetibilidade diferentes (M e N), sendo que um foi resistente somente aos β -lactâmicos e o outro a duas classes de antimicrobianos (β -lactâmicos e sulfametoxazol-trimetoprima).

Tabela 5: Perfis de suscetibilidade dos *S. aureus* isolados de tonsilas provenientes de pacientes com tonsilite de repetição.

Nº de isolados (60) N (%)	Perfis de suscetibilidade	Fenótipos (N= 16)
27(45,0)	RSSSSSSSSSS	A
7(11,7)	SSSSSSSSSSS	B
4(6,7)	RSSRRRSSSSS* ^M	C
3(5,0)	RSSSSSSSSRS	D
3(5,0)	RSRSSSSSSSS	E
2(3,3)	SSSSSSSSSSRS	F
2(3,3)	RSRSSSSSSRS	G
2(3,3)	RRSSSSSSSSS	H
2(3,3)	RRSSSSSSSSRS	I
2(3,3)	RSSRRRSSSSR* ^M	J
1(1,7)	RRSSSSSSSSRR ^M	K
1(1,7)	RRRSSSSRSSSS	L
1(1,7)	RSRRSSSRSSSS [†]	M
1(1,7)	RSRRSSSSSSSS [†]	N
1(1,7)	RSRSSSSSSSSR	O
1(1,7)	RSSSSSSSSRR ^M	P
60(100)		

R: resistência; S: sensível. Os antimicrobianos estão organizados na sequência: penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, ceftriaxona, eritromicina, clindamicina, quinupristina-dalfopristina, sulfametoxazol- trimetoprima, linezolida, rifampicina, ciprofloxacina, e tetraciclina.

*: MLSbi.

†: *mecA* +.

^(M): MDR

A diversidade de padrões fenotípicos de resistência evidenciados mostra a complexidade do agente envolvido na faringotonsilite recorrente e chama a atenção para a seleção e disseminação de cepas resistentes, principalmente pela

diversidade bacteriana encontrada na região das tonsilas favorecendo processos de recombinação genética tanto intraespécie quanto interespecie.

Uma das grandes preocupações quando se analisa perfis de resistência dos *Staphylococcus aureus* é a presença de cepas multirresistentes aos antimicrobianos comumente utilizados. A multirresistência é definida quando se observa resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos et al. 2012). O surgimento de cepas resistentes a várias classes de antimicrobianos, principalmente no ambiente hospitalar, devido à exposição frequente a antimicrobianos, limita cada vez mais as opções de tratamento dos pacientes (Chambers 2001). Nosso trabalho identificou oito (13,3%) isolados com perfil de multirresistência (Tabela 5). Mesmo não apresentando dados suficientes para definir os isolados como sendo associados à comunidade ou ao ambiente hospitalar, a multirresistência é evidenciada como uma característica de isolados provenientes de ambiente hospitalar (Ahmad et al. 2009; Baranovich et al. 2010; Rodríguez-Noriega & Seas 2010), apesar de evidências de que cepas CA-MRSA podem se disseminar no ambiente hospitalar e adquirir perfil de multirresistência de cepas hospitalares (Huang et al. 2006).

Os pacientes envolvidos no estudo eram atendidos na ala ambulatorial e principalmente pelo fato de serem crianças e adolescentes que estão em constante contato com outras crianças e seus familiares (Filizzola et al. 1998), a disseminação de multirresistência pode ultrapassar barreiras hospitalares e se tornar um desafio na forma de tratamento e no controle dessa disseminação. Nota-se, portanto, a ocorrência de falhas nos tratamentos aos pacientes tendo em vista a faringotonsilite de repetição e que o uso excessivo e, ou incorreto de antimicrobianos provavelmente possibilitou essa multirresistência.

Cepas MRSA costumam ser mais resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados do que as cepas MSSA. Em geral, os MRSA são mais resistentes aos antimicrobianos devido a presença da região cromossômica *SCCmec* que favorece o processo de recombinação de genes de resistência e possivelmente devido os MRSA serem comumente isolados de amostras oriundas de pacientes internados que foram expostos a diferentes antimicrobianos ou que adquiriram resistência das cepas hospitalares (Chambers 1997; Chambers 2001). Em nosso estudo, no entanto, os MRSA não apresentaram perfil de resistência a

mais antimicrobianos quando comparados aos isolados MSSA, pelo contrário, todas as cepas com perfil de multirresistência foram MSSA, mostrando que a disseminação de multirresistência não esteve associado à presença do gene *mecA*.

Em relação à leucocidina PVL, encontramos apenas uma cepa de *S. aureus* suscetível à meticilina apresentando o gene para a leucocidina (Figura 8). Este gene esteve presente em uma das cepas multirresistentes. A leucocidina PVL pode ser encontrada tanto em MSSA quanto em MRSA (Cunnington et al. 2009; Gasch et al. 2012; Shallcross et al. 2013). Baranovich et al (2010) evidenciaram, uma alta (55%) prevalência de MSSA PVL-positivos em contraste com MRSA PVL-positivos. Khosravi et al. (2012) não identificaram correlação entre a presença de gene *mecA* e gene para PVL.

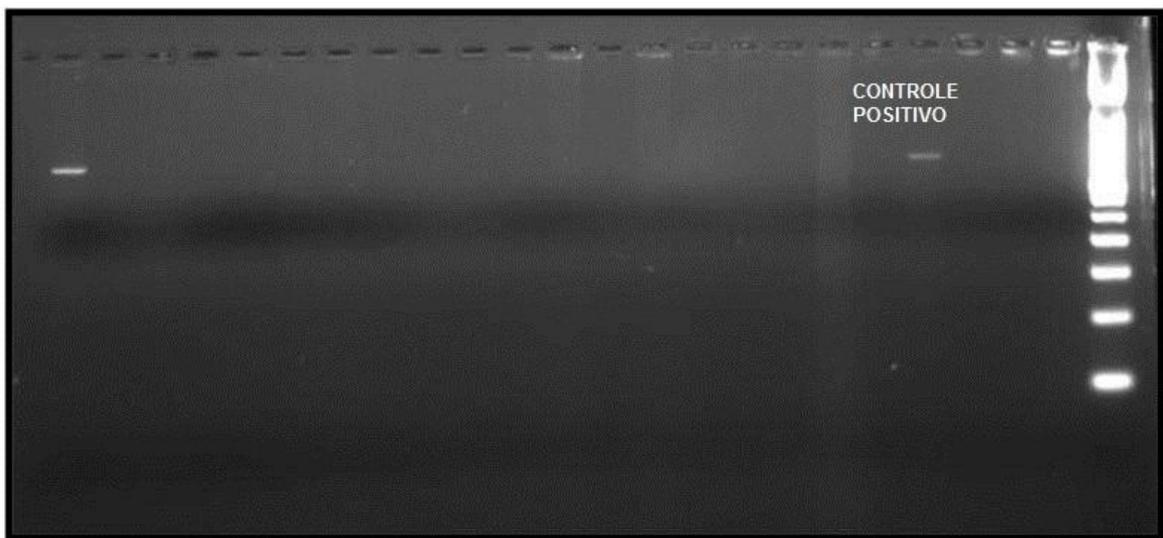


Figura 8: PCR evidenciando apenas uma cepa portando o gene que codifica a leucocidina de Pantón-Valentine.

Staphylococcus aureus produzindo a toxina PVL geralmente estão mais associados com crianças e adultos jovens do que as cepas PVL-negativas (Ebert et al. 2009; Vandenesch et al. 2012; Zhao et al. 2012; Shallcross et al. 2013). Regiões anatômicas como a garganta, podem ser importantes sítios de infecção de *S. aureus* PVL-positivos (Shallcross et al. 2013).

A presença da leucocidina Pantón-Valentine gera preocupação quando observamos que nossas amostras são de crianças e adolescentes atendidos na

ala ambulatorial. Nessa faixa etária há maior contato com outras pessoas tanto familiares quanto em creches e escolas, o que as tornam, quando portadoras assintomáticas, fontes de disseminação de bactérias na comunidade (Chambers 2001). Essa propagação pode ocorrer devido ao fato de que diferentes *S. aureus* PVL-positivos podem transportar diferentes fagos lisogênicos contendo genes para PVL, e estes podem ser facilmente transmitidos horizontalmente e infectar outras cepas de *Staphylococcus aureus* PVL-negativos. Cepas PVL-positivas possuem grande atração pela membrana de cepas PVL-negativas (Narita et al., 2001; Vandenesch et al. 2012).

A literatura relata que cepas que apresentam o gene que codifica a leucocidina PVL, principalmente cepas MRSA, são mais frequentes em infecções associadas à comunidade (Lowy 2003; Naimi et al. 2003; Vandenesch et al. 2003; Huang et al. 2007; Makgotlho et al. 2009; Gowrishankar et al. 2013) apesar de Rossney et al. (2007) terem encontrado que a maioria dos isolados CA-MRSA (77.8%; 42/54) foram PVL-negativos. Em nosso trabalho não há dados dos pacientes suficientes para definir se nossas amostras referem-se à cepas de *S. aureus* adquiridos na comunidade. A definição dessas cepas baseada apenas em critérios clínico-epidemiológicos e em análises microbiológicas básicas não assegura que a aquisição da bactéria tenha sido na comunidade, pois alguns pacientes podem ter antecedentes médicos incertos, apresentando características de infecção nosocomial. Além disso, em alguns casos, os pacientes podem conviver com trabalhadores da área de saúde, possuindo contato com ambiente hospitalar de forma indireta, ou por convívio com familiares que adquiriram alguma bactéria no ambiente hospitalar.

A partir do dendrograma gerado pela análise de PFGE, foi possível identificar 10 clusters que agruparam 36 (60,0%) dos 60 isolados (Figura 9), restando 24 perfis independentes. Os clusters (CL) 1, 2, 7, 9 e 10 agruparam dois isolados, os CL5 e 6 agruparam três isolados, o CL 8 agrupou quatro, o CL 3 agrupou seis e o CL 4 agrupou dez isolados. O agrupamento dos isolados em 10 clusters (>80% similaridade) nos mostra que não foi detectado um clone específico associado à colonização das tonsilas.

O CL 4 apresentou dois perfis clonais, um deles agrupou dois isolados e o outro quatro isolados além de quatro outras amostras com pulsotipos diferentes.

Todos os isolados foram obtidos de pacientes diferentes e não apresentaram resistência a mais de duas classes de antimicrobianos, inclusive o isolado 75.1 considerado MRSA (Figura 9).

Nove pacientes (17, 36, 85, 90, 111, 124, 129, 133, 134) apresentaram mais de um isolado genotipicamente diferente na tonsila. Três destes pacientes (36; 129; 124) mostraram estar colonizados, simultaneamente, por uma cepa multirresistente e uma cepa resistente apenas à penicilina. A presença de múltiplas cepas em pacientes oferece a oportunidade de transferência de informações genéticas entre eles (Rodríguez-Noriega & Seas 2010). Um paciente (133) apresentou quatro isolados simultaneamente, sendo que dois deles apesar de estarem agrupados no mesmo cluster, apresentaram pulsotipos diferentes. Isto demonstra a dinâmica de colonização e possibilidade de alteração genética dos isolados, falando a favor da persistência destes isolados na tonsila, favorecendo alterações genotípicas ao longo do tempo.

O agrupamento no mesmo cluster de isolados obtidos de pacientes diferentes sugere que estes podem ter uma origem comum e que estejam associados à patogenia das faringotonsilites recorrentes. Investigações futuras são necessárias para determinar as características genéticas comuns destes isolados que levam a disseminação em pacientes com mesmo perfil clínico.

As cepas com fenótipo MLSb induzível não foram agrupadas em nenhum clone específico, porém dois isolados (124.2V e 129.1V) foram agrupados no mesmo cluster (CL 3) e tiveram o mesmo fenótipo de resistência. Também não identificamos um clone em relação aos dois isolados MRSA (75.1 no CL 4 e o 90.2 com <80% de similaridade) (Figura 9). Essa diversidade de perfis genotípicos também foi observada por Zautner et al. (2010), pois em 76 isolados de *S. aureus* identificaram 24 tipos diferentes de perfis agrupados.

A diversidade genética observada enfatiza a importante discussão a respeito da preocupação com a recombinação genética e a disseminação de cepas resistentes. Padrões semelhantes de PFGE associados com fenótipos diferentes podem mostrar mudanças adquiridas pelas cepas durante o tempo com perda ou aquisição de resistência (Aleksun & Levy 2007). Clones podem evoluir de MSSA à MRSA ou vice-versa através da aquisição e excisão da região *SCCmec*, respectivamente (Donnio et al. 2005; Rodríguez-Noriega & Seas 2010).

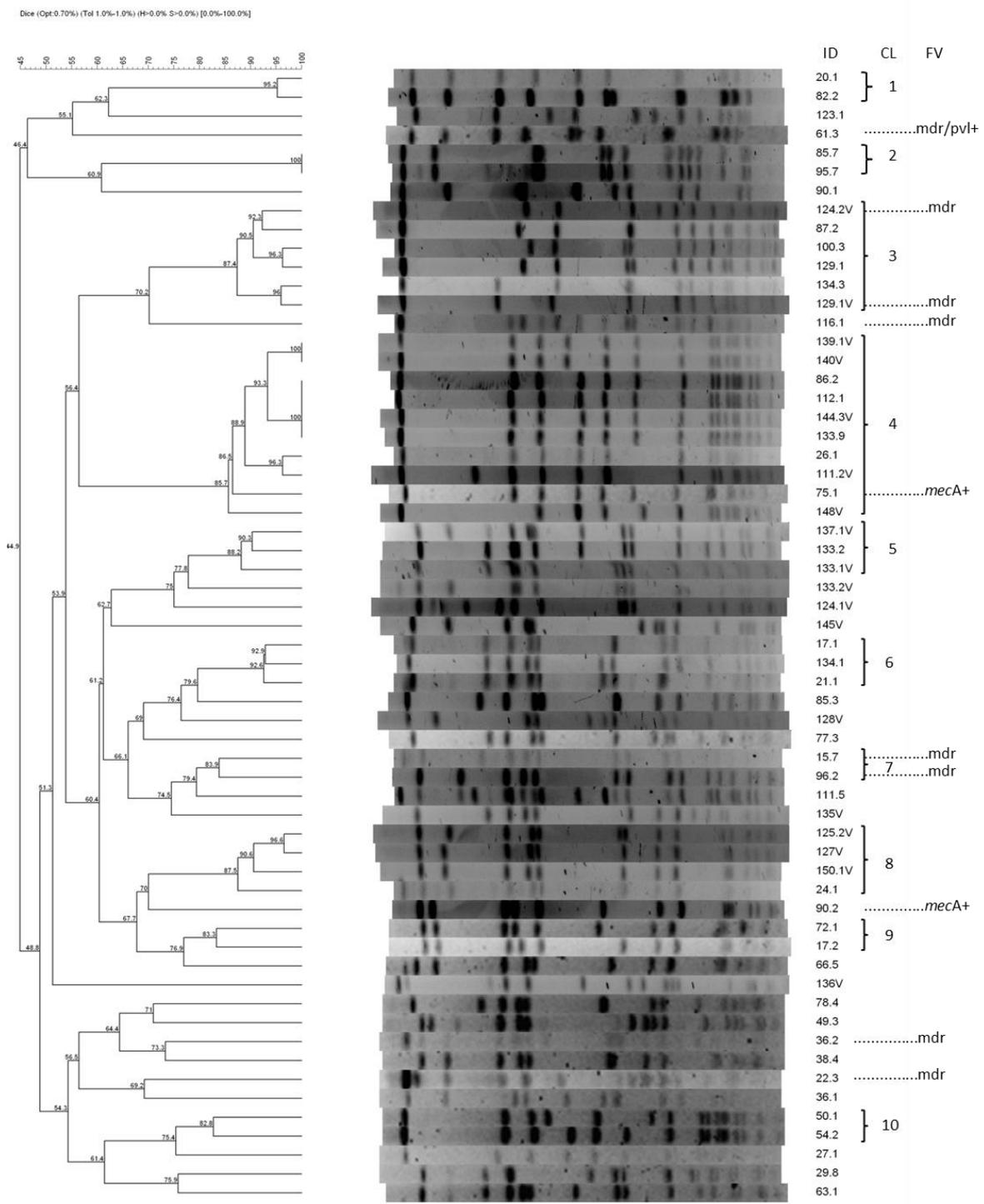


Figura 9: Dendrograma obtido da análise por PFGE de *S. aureus* isolados de pacientes submetidos à tonsilectomia em hospital escola de Goiânia, Goiás.
 CL= Cluster; * MRSA.

6 CONCLUSÕES

O estudo permitiu constatar considerável prevalência de *S. aureus*, em comparação com o *S. pyogenes*, em tonsilas de pacientes submetidos à tonsilectomia, sugerindo que esta bactéria pode desempenhar um papel importante nas faringotonsilites como o principal agente causal ou em associação com outros agentes etiológicos como *Streptococcus* sp.

A detecção de *S. aureus* com fenótipos de resistência antimicrobiana diferentes, mostra a complexidade e a variabilidade dos isolados associados à faringotonsilites recorrentes. Apesar destes não apresentarem alta frequência de multidroga-resistência, a possibilidade de transferência de genes de resistência para bactérias sensíveis deve ser considerada.

Não houve a detecção de um clone associado à colonização das tonsilas de pacientes submetidos à tonsilectomia, mas o agrupamento de isolados obtidos de pacientes diferentes em clusters e clones evidencia a possibilidade de origem comum dos isolados, falando a favor da persistência da bactéria nas tonsilas, mesmo os pacientes não apresentando infecção aparente, e possível disseminação na comunidade.

O conhecimento dos clones circulantes dentro de uma região torna-se importante para avaliar as relações entre tipos clonais, características patogênicas, escolha de antibioticoterapia e possíveis formas de controle.

A evidência da prevalência de copatógenos na infecção tonsilar recorrente possibilita à comunidade científica uma melhor compreensão da patogenia e da evolução desta infecção que acomete muitas crianças por todo o mundo. Este trabalho identificou a complexidade no entendimento desta patologia devido às alterações da microbiota, considerando a ocorrência de alterações irreversíveis na estrutura e equilíbrio da microbiota das tonsilas, bloqueando o efeito inibitório contra bactérias patogênicas e da sua natureza polimicrobiana.

Os resultados apontam para mudança no paradigma de diagnóstico e tratamento de faringotonsilites recorrentes com vistas a viabilizar o uso correto de antimicrobianos e diminuir a recorrência que é a principal causa de tonsilectomia.

REFERÊNCIAS

1. Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 24 (Suppl 1): S67-S73, 1997.
2. Ahmad N, Ruzan IN, Ghani MKA, Hussin A, Nawi S, Aziz MN, Maning N, Eow VLK. Characteristics of community- and hospital- acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying SCC mec type IV isolated in Malaysia. *J Med Microbiol* 58: 1213-1218, 2009.
3. Aires de Sousa M, Parente CE, Vieira-da-Motta O, Bonna IC, Silva DA, Lencastre H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 73: 3845-3849, 2007.
4. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128: 1037-1050, 2007.
5. Almeida LC, Pimenta-Rodrigues MV, Moris DV, Fortaleza CMCB, Cunha MLRS. Avaliação fenotípica e genotípica do perfil de resistência de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de culturas clínicas e de vigilância de um hospital de ensino brasileiro. *Colloquium Vitae* 4 (2): 68-78, 2012.
6. Al-Mazrou KA, Al-Khattaf AS. Adherent biofilms in adenotonsillar disease in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134: 20-23, 2008.
7. Al-Najjar FYA, Uduman SA. Clinical utility of a new rapid test for the detection of group A Streptococcus and discriminate use of antibiotics for bacterial pharyngitis in an outpatient setting. *Int J Infect Dis* 12: 308-311, 2008.
8. Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infect Microbiol Clin* 27 (5): 290- 297, 2009.
9. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 12: 16-23, 2006.
10. Averono G, Vidali M, Olina M, Basile M, Bagnati M, Bellomo G, Aluffi P. Evaluation of amoxicillin plasma and tissue levels in pediatric patients undergoing tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 74: 995-998, 2010.
11. Avcia IY, Kilicb S, Acikelb CH, Hasdeb MUM, Eyiguna CP, Pahsaa A, Cetinerd S. Outpatient prescription of oral antibiotics in a training hospital in Turkey: Trends in the last decade. *J Infect* 52: 9-14, 2006.

12. Avilés AGP, Zaragoza COM. *Streptococcus pyogenes*: susceptibilidad in vitro y papel de las bacterias productoras de betalactamasa en la persistencia de la faringoamigdalitis estreptocócica. *Aten Primaria* 25: 542-545, 2000.
13. Balbani APS, Montovani JC, Carvalho LR. Pharyngotonsillitis in children: view from a sample of pediatricians and otorhinolaryngologists. *Rev Bras Otorrinolaringol* 75: 139-146, 2009.
14. Banerjee R, Gretes M, Basuino L, Strynadka N, Chambers HF. In vitro selection and characterization of ceftobiprole-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (6): 2089-2096, 2008.
15. Banerjee R, Gretes M, Harlem C, Basuino L, Chambers HF. A mecA-negative strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level β -Lactam resistance contains mutations in three genes. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (11): 4900-4902, 2010.
16. Baranovich T, Zaraket H, Shabana II, Nevzorova V, Turcutyucov V, Suzuki H. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. *Clin Microbiol Infect* 16: 575-582, 2010.
17. Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, Barahona HG, Barrón VP, Paradisi F, Rossolini GM. High Prevalence of Acquired Antimicrobial Resistance Unrelated to Heavy Antimicrobial Consumption. *J Infect Dis* 189: 1291-1294, 2004.
18. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496, 1966.
19. Berquó LS, Barros AJD, Lima RC, Bertoldi AD. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade. *Rev Saúde Pública* 38: 358-364, 2004.
20. Bhattacharyya N, Kepnes LJ, Shapiro J. Efficacy and quality-of-life impact of adult tonsillectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 1347-50, 2001.
21. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney Jr JM, Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A Streptococcal pharyngitis. *Clin Infect Dis* 35: 113–125, 2002.

22. Braoios A, Oliveira LR, Lima IBS, Kendrew E. Portadores Assintomáticos de *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* entre crianças atendidas em uma creche. *Colloquium Vitae* 1: 25-29, 2009.
23. Brodsky L. Modern assesment of tonsils and adenoids. *Pediatr Clin North America* 36 (6): 1551-1569, 1989.
24. Brodsky L, Nagy M, Volk M, Stanievich J, Moore L. The relationship of tonsil bacterial concentration to surface and core cultures in chronic tonsillar disease in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 21: 33-39, 1991.
25. Brodsky L, Koch RJ. Bacteriology and immunology of formal and diseased adenoids in children. *Arch Otolaryngo head Neck Surg* 119: 821-829, 1993.
26. Brook I. The role of β -lactamase producing bacteria and bacterial interference in streptococcal tonsillitis. *Int J Antimicrob Agents* 17: 439-442, 2001.
27. Brook I. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngol - Head and Neck Surg* 133: 139-146, 2005.
28. Brook I, Gober AE. Recovery of interfering and β -lactamase-producing bacteria from group A β -haemolytic streptococci carriers and non-carriers. *J Med Microbiol* 55: 1741–1744, 2006.
29. Brook I, Foote PA. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from the surface and core of tonsils in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 70: 2099-2102, 2006.
30. Brook I. Overcoming penicillin failures in the treatment of group A streptococcal pharyngo-tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71: 1501-1508, 2007a.
31. Brook I. Penicillin failure in the treatment of acute and relapsing tonsillopharyngitis is associated with copathogens and alteration of microbial balance: a role for cephalosporins. *Clin Pediatr* 46 (4S): 17S-24S, 2007b.
32. Brook I, Gober AE. Failure to eradicate streptococci and β -lactamase producing bacteria. *Acta Paediatr* 97: 193-195, 2008.
33. Brook I, Gober AE. Rate of eradication of group A β -hemolytic streptococci in children with pharyngo-tonsillitis by amoxicillin and cefdinir. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73: 757-759, 2009.

34. Brook I. Penicillin failure in the treatment of Streptococcal pharyngo-tonsillitis. *Curr Infect Dis Rep* 15: 232-235, 2013.
35. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233, 1995.
36. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (3): 969-976, 2010.
37. Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazao N, de Lencastre H, Almeida JS. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43: 5483-5490, 2005.
38. Cartwright EJP, Paterson GK, Raven KE, Harrison EM, Gouliouris T, Kearns A, Pichon B, Edwards G, Skov RL, Larsen AR, Holmes MA, Parkhill J, Peacock SJ, Török ME. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 51 (8): 2732-2734, 2013.
39. Casey JR, Pichichero ME. The evidence base for cephalosporin superiority over penicillin in streptococcal pharyngitis. *Diagn Microb Infect Dis* 57: 39S-45S, 2007.
40. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish University Hospital. *J Microbiol Immunol Infect* 43 (6): 524-529, 2010.
41. Chambers HF, Archer G, Matsushashi M. Low-level methicillin resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 33 (4): 424-428, 1989.
42. Chambers HF. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10 (4): 781-791, 1997.
43. Chambers HF. The Changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7 (2): 178-182, 2001.
44. Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wanga CH, Lauderdale TLY. Panton – Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant

- Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible *mecA*-positive methicillin-resistant *S. aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65: 351-357, 2009.
45. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 634-636, 2003.
 46. Chung MLH, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P. Multilaboratory Project Collaborators 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 6: 189-198, 2000.
 47. CLSI. *Clinical Laboratory Standards Institute*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23, 2013.
 48. Conley J, Olson ME, Cook LS, Ceri H, Pahn V, Davies HD. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J Clin Microbiol* 41: 4043-4048, 2003.
 49. Conlon BJ, Donnelly MJ, Mcshane DP. Improvements in health and behavior following childhood tonsillectomy: a parental perspective at 1 year. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 41: 155-161, 1997.
 50. Costa FN, Santos O, Weckx LLM, Pignatari SSN. Estudo microbiológico do core e superfície das amígdalas palatinas em crianças portadoras de faringoamigdalites de repetição e hipertrofia adenoamigdaliana. *Rev Bras Otorrinolaringol* 69: 181-184, 2003.
 51. Cuirolo A, Canigia LF, Gardella N, Fernández S, Gutkind G, Rosato A, Mollerach M. Oxacillin- and cefoxitin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 37: 174-185, 2011.
 52. Cunnington A, Brick T, Cooper M, Danin J, Hunt D, Jeanes A, Kearns AM, Nolan M, Lyall H. Severe invasive Panton-Valentine leucocidin positive

- Staphylococcus aureus* infections in children in London, UK. *J Infect* 59 (1): 28-36, 2009.
53. Dal Rio ACC, Nicola EDN, Teixeira ARF. Halitose: proposta de um protocolo de avaliação. *Rev Bras Otorrinolaringol* 73: 835-842, 2007.
 54. DATASUS. Ministério da Saúde [Internet]. Acesso em set. 2013. Informações de Saúde. Assistência à Saúde. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>> 2013.
 55. Dell'Aringa AR, Juarez AJC, Melo C, Nardi JC, Kobari K, Filho RMP. Análise histopatológica de produtos de adenotonsilectomia de janeiro de 2001 a maio de 2003. *Rev Bras Otorrinolaringol* 71 (1): 18-22, 2005.
 56. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 (3): 297-302, 1945.
 57. Discolo CM, Darrow DH, Koltai PJ. Infectious indications for tonsillectomy. *Pediatr Clin of North America* 50: 445-458, 2003.
 58. Donnio PY, Oliveira DC, Faria NA, Wilhelm N, Le Coustumier A, Lencastre H. Partial excision of the chromosomal cassette containing the methicillin resistance determinant results in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43: 4191-4193, 2005.
 59. Dos Santos AGP, Berezin EM. Comparative analysis of clinical and laboratory methods for diagnosing streptococcal sore throat. *Jornal de Pediatria* 81: 23-28, 2005.
 60. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -Lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23: 160-201, 2010.
 61. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 48: 315-316, 2001.
 62. Ebert MD, Sheth S, Fishman EK. Necrotizing pneumonia caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing cause of 'mayhem in the lung'. *Emerg Radiol* 16: 159-162, 2009.
 63. Edwards AM, Massey RC, Clarke SR. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol Oral Microbiol* 27: 1-10, 2012.

64. Ejzenberg B, Nascimento SL, Gilio AE, Lotufo JP, Okay Y. Faringoamigdalites episódicas e recorrentes. *Pediatria (São Paulo)* 20: 191-210, 1998.
65. Eliasson I, Holst E, Molstad S, Kamme C. Emergence and persistence of β -lactamase-producing bacteria in the upper respiratory tract in children treated with β -lactam antibiotics. *American J Medicine* 88 (Suppl. 5A): 51S-55S, 1990.
66. Falser N, Dalhoff A, Weuta H. Ciprofloxacin concentrations in tonsils following single or multiple administrations. *Infection* 16 (Suppl. 1): S14-S18, 1988.
67. Figueiredo CR, Pignatari SSN, Valera FPC, Avelino MAG. Rinossinusites e faringotonsilites em crianças. *Pediatria Moderna* 37: 647-659, 2001.
68. Filho OL. Anatomia cirúrgica das amígdalas palatinas. In: *Temas de Otorrinolaringologia*. Editora Manole Ltda. São Paulo. 1ªEd., p 23-60, 1980.
69. Filizzola VCC, Dualibi APFF, Solé D, Weckx LLM. Risk factors for recurrent acute tonsillitis in children. *Rev Bras Alerg Imunopatol* 21 (4): 100-104, 1998.
70. Fujihara K, Goto H, Hiraoka M, Hayashi M, Hotomi M, Tamura S, Kuki K, Yamanaka N, Koltai PJ. Tonsillitis index: An objective tool for quantifying the indications for tonsillectomy for recurrent acute tonsillitis. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 69: 1515-1520, 2005.
71. García-Álvarez L, Holden, MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RLR, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11 (8): 595-603, 2011.
72. Gasch O, Hornero A, Domínguez MA, Fernández A, Suárez C, Gómez S, Camoez M, Linares J, Ariza J, Pujol M. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clone related to the early pandemic phage type 80/81 causing an outbreak among residents of three occupational centres in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol Infect* 18: 662-667, 2012.

73. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753-759, 2002.
74. Glover JA. The incidence of tonsillectomy in school children. *Int J Epidemiol* 37: 9-19, 2008.
75. Gowrishankar S, Thenmozhi R, Balaji K, Pandian SK. Emergence of methicillin-resistant, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* among patients associated with group A Streptococcal pharyngitis infection in southern India. *Infect Genet Evol* 14: 383-389, 2013.
76. Grossman RF. The role of fluoroquinolones in respiratory tract infections. *J Antimicrob Agents Chemother* 40 (Suppl. A): 59-62, 1997.
77. Guerra AFM, Gonçalves DU, Cortes MCJW, Alves CRL, Lima TMA. Otorrinolaringologia pediátrica no Sistema Público de Saúde de Belo Horizonte. *Rev Saúde Públ* 41: 719-725, 2007.
78. Gul M, Okur E, Ciragil P, Yildirim I, Aral M, Kilic MA. The comparison of tonsillar surface and core cultures in recurrent tonsillitis. *American J Otolaryngol-Head Neck Med Surg* 28: 173-176, 2007.
79. Gunnarsson RK, Holm SE, Soderstrom M. The prevalence of potential pathogenic bacteria in nasopharyngeal samples from individuals with a respiratory tract infection and a sore throat – implications for the diagnosis of pharyngotonsillitis. *Family Practice* 18: 266-271, 2001.
80. Gurdal Y, Kemalettin A. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. *J Med Microbiol* 56: 342-345, 2007.
81. Hackbarth CJ, Kocagoz T, Kocagoz S, Chambers HF. Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (1): 103-106, 1995.
82. Harputluoglu U, Egeli E, Sahin I, Oghan F, Ozturka O. Nasopharyngeal aerobic bacterial flora and *Staphylococcus aureus* nasal carriage in deaf children. *Int J Pediat Otorhinolaryngol* 69: 69-74, 2005.

83. Henze UU, Berger-Bachi B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (9): 2121-2125, 1996.
84. Hirakata Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Kobayashi I, Kohno S. Antimicrobial susceptibilities of potential bacterial pathogens in adults with acute respiratory tract infections prospective epidemiological network investigating community-acquired infection surveillance in Nagasaki (Penicillin) study. *Diag Microbiol Infect Dis* 51: 271-280, 2005.
85. Hiramatsu K, Hanks H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-136, 1997.
86. Hungria H. O problema das amígdalas e vegetações adenóides. In: *Otorrinolaringologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p 167-170, 2000.
87. Huang H, Flynn NM, King JH, Monchaud C, Morita M, Cohen SH. Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MRSA infections in Sacramento, California. *J Clin Microbiol* 44 (7): 2423-2427, 2006.
88. Huang YH, Tseng SP, Hu JM, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. *Clin Microbiol Infect* 13: 717-724, 2007.
89. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, Lencastre H, Perreten V, Holden MTG, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, Westh H, O'Brien F, Tenover FC, Oliveira DC, Boyle-Vavra S, Laurent F, Kearns AM, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Sollid JE, John JF, Daum R, Soderquist B, Buistx G. Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother* October 56 (10): 4997-4999, 2012.
90. Jensen A, Fago-Olsen H, Sorensen CH, Kilian M. Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis. *PLoS ONE* 8 (2): 2013.
91. Júnior RGC, Brandão FH, Carvalho MRMS, Aquino JEP, Pereira SH, Eiras B. Perfil de pacientes submetidos à adenoidectomia, amigdalectomia e adenoamigdalectomia pela disciplina de otorrinolaringologia da UNISA. *Arq Int Otorrinolaringol* 12 (2): 189-193, 2008.

92. Kaiser TDL, Pacheco FC, Lima AA, Pereira EM, Santos KRN, Nunes APF. Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação da suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp, isoladas de um hospital de Vitória, Estado do Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop* 43 (3): 298-303, 2010.
93. Khosravi AD, Hoveizavi H, Farshadzadeh Z. The prevalence of genes encoding leukocidins in *Staphylococcus aureus* strains resistant and sensitive to methicillin isolated from burn patients in Taleghani hospital, Ahvaz, Iran. *Burns* 38: 247-251, 2012.
94. Kielmovitch IH, Keleti G, Bluestone CD, Wald ER, Gonzáles C. Microbiology of obstructive tonsillar hypertrophy and recurrent tonsillitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115: 721-724, 1989.
95. Kim C, Milheirico C, Gardete S, Holmes MA, Holden MTG, Hermínia de Lencastre H, Tomasz A. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem* 287 (44): 36854-36863, 2012.
96. Kumar VA, Steffy K, Chatterjee M, Sugumar M, Dinesh KR, Manoharan A, Karim S, Biswas R. Detection of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* isolates by use of chromogenic medium MRSA ID. *J Clin Microbiol* 51 (1): 318-319, 2013.
97. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34: 482-492, 2002.
98. Lewis II JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 40: 280-285, 2005.
99. Lim JA, Kwon AE, Kim SK, Cong Y, Lee K, Choi EC. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in Korean hospital. *J Antimicrob Chemother* 49: 489-495, 2002.
100. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-

- producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29: 1128-1232, 1999.
101. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-532, 1998.
 102. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-1273, 2003.
 103. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281, 2012.
 104. Makgotlho PE, Kock MM, Hoosen A, Lekalakala R, Omar S, Dove M, Ehlers MM. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57: 104-115, 2009.
 105. Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia A, Schito GC. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J Clin Microbiol* 38: 866-869, 2000.
 106. Maroto DP, Quezel NM, Rodríguez IL, Veja EM, Morente JCC, Rodríguez VP, Ruiz EF, Jiménez MC. Situación actual de las resistencias a antimicrobianos en infecciones amigdalares. *Acta Otorrinolaringol Esp* 57: 171-175, 2006.
 107. Matos FS, Reale JA, Neto JS, Barata L, Pamponet LO, Brito RMPX, Costa VCNB, Viana VMS, Carvalho CMN. Antibiotics use in Streptococcal tonsillitis. *Gazeta Médica da Bahia* 77: S23-S27, 2007.
 108. McDougal LK, Thornsberry C. Role of β -lactamase in *Staphylococcal* resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin. Microbiol* 23 (5): 832-839, 1986.
 109. McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -Lactamase regulators. *J Bacteriol* 183 (23): 6862-6868, 2001.

110. Medrano FL, Aguado JM. *Staphylococcus aureus* con sensibilidade diminuída a vancomicina. Nuevos problemas para el clínico. *Med Clin (Barc)* 135 (4): 160-161, 2010.
111. Mena Viveros N. Biofilms en otorrinolaringología. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.otorri.2012.08.005>.
112. Mertz D, Frei R, Jaussi B, Tietz A, Stebler C, Fluckiger U, Widmer AF. Throat Swabs Are Necessary to Reliably Detect Carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 45: 475-477, 2007.
113. Morag A, Ocra PL. Immunologic aspect of tonsils. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 84 (Supp. 19): 37-43, 1975.
114. Morais S, Teles A, Ramalheira E, Roseta J. Amigdalite estreptocócica - presunção clínica versus diagnóstico. *Acta Medica Portuguesa* 22: 773-778, 2009.
115. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 2240-2244, 1991.
116. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Staphylococcus* e microrganismos relacionados. In: *Microbiologia Médica*. Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, p 215-230, 2006.
117. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 290 (22): 2976-2984, 2003.
118. Narita S, Kaneko J, Chiba J, Piemont Y, Jarraud S, Etienne J, Kamio Y. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, ϕ SLT. *Gene* 268: 195-206, 2001.
119. Nascimento-Carvalho CM, Marques HHS. Recomendação do Departamento de Infectologia da Sociedade Brasileira de Pediatria para conduta de crianças e adolescentes com faringoamigdalites agudas. *Jornal de Pediatria* 82: 79-80, 2006.

120. Nilsson P, Ripa T. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *J Clin Microbiol* 44 (9): 3334-3339, 2006.
121. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Cultura de amostras do trato respiratório superior. In: *Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica*. Elsevier Editora Ltda, 3º Ed., São Paulo, p 224-230, 2010.
122. Palavecino E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Lab Med* 24 (2): 403-418, 2004.
123. Pascuala A, Bañob JR, Arellano ER, Molac J, Martínez LM. Sensibilidad disminuida a vancomicina en cepas isogénicas de *Staphylococcus aureus* aisladas del mismo paciente. *Med Clin (Barc)* 117: 416-418, 2001.
124. Pereira C. Noções anatômicas. In: *Otorrinolaringologia para uso do médico prático*. Editora Guanabara, Koogan S.A., 3ªEd., Rio de Janeiro, p 33-69, 1957.
125. Pereira LMP, Juman S, Bekele I, Seepersadsingh N, Adesiyun AA. Achado de bactérias selecionadas em crianças de Trinidad com doença amigdaliana crônica. *Rev Bras Otorrinolaringol* 74: 903-911, 2008.
126. Petinaki E, Kontos F, Maniatis NA. Emergence of two oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clones in a Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 50: 1090-1091, 2002.
127. Pichichero ME. Group A β -hemolytic streptococcal infections. *Pediatr Rev* 19 (9): 291-302, 1998.
128. Pichichero ME, Casey JR. Systematic review of factors contributing to penicillin treatment failure in *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. *Otolaryngol-Head and Neck Surgery* 137 (6): 851-857, 2007.
129. Pitrez PMC, Pitrez JLB. Acute upper respiratory tract infections: outpatient diagnosis and treatment. *J Pediatr* 79: S77-S86, 2003.
130. Podbielski A, Beckertb S, Schattkec R, Leithauser F, Lestina F, Gobler B, Kreikemeyer B. Epidemiology and virulence gene expression of intracellular group A streptococci in tonsils of recurrently infected adults. *Int J Med Microbiol* 293: 179-190, 2003.
131. Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an

international collection of staphylococci: Validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51: 57-62, 2005.

132. Raju G, Selvam EM. Evaluation of microbial flora in chronic tonsillitis and the role of tonsillectomy. *Bangladesh J Otorhinolaryngol* 18 (2): 109-113, 2012.
133. Ripoll MA, Orero A, González J. Prescripción de antimicrobianos en atención primaria en España. Motivos y características. *Med Gen* 48: 785-790, 2002.
134. Rodríguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *Braz J Infect Dis* 14 (Suppl. 2): S87-S96, 2010.
135. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Sistema Linfático (Órgãos Linfáticos ou Sistema Imunológico). In: *Histologia texto e atlas*. Editora Médica Panamericana. São Paulo. 2ªEd., p 307-328, 1993.
136. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol* 45 (8): 2554-2563, 2007.
137. Rozenbaum R, Sampaio MG, Batista GS, Garibaldi AM, Terra GMF, Souza MJ, Vieira EN, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Figueiredo AMS. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Braz J Med Biolog Res* 42: 756-760, 2009.
138. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab* 43 (6): 413-423, 2007.
139. Scalabrin R, Buss GD, Iamaguchi KCS, Cardoso CL, Garcia LB. Isolation of *Streptococcus pyogenes* in individuals with pharyngotonsillitis and antimicrobial susceptibility testing. *Rev Bras Otorrinolaringol* 69: 814-818, 2003.
140. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. Flora microbiana normal. In: *Microbiologia- mecanismos das doenças infecciosas*. Editora Guanabara Koogan, 3ªEd, Rio de Janeiro, p 10-15, 2002.

141. Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 43 (6): 783-792, 1999.
142. Schwartz B. Tonsillite viral ou bacteriana? In: Sih T. *Infectologia pediátrica*. Rio de Janeiro: Revinter, p.47-51, 2001.
143. Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Anti-microbial Resistance. *N Engl J Med* 337 (7): 441-446, 1997.
144. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in *staphylococcal* disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13: 43-54, 2013.
145. Sih TM, Bricks LF. Optimizing the management of the main acute infections in pediatric ORL: tonsillitis, sinusitis, otitis media. *Rev Bras Otorrinolaringol* 74: 755-762, 2008.
146. Smith RD, Coast J. Antimicrobial resistance: a global response. *Bull World Health Organization* 80: 126-133, 2002.
147. Sneath PH, Sokal RR. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 573p, 1973.
148. Sollid JUE, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infect Genet Evol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.020>.
149. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* LGA25. *Clin Microbiol Infect* 18: 395-400, 2012.
150. Stuck BA, Windfuhr JP, Genzwurker H, Schrotten H, Tenenbaum T, Gotte K. Tonsillectomy in Children. *Rev Deutsches Ärzteblatt International* 105: 852-861, 2008.
151. Swenson JM, Skov R, Patel JB. The Cefoxitin Disk Test - What a Clinical Microbiologist Needs To Know. *Clin Microbiol Newsletter* 29 (5): 33-40, 2007.

152. Swidsinski A, Goktas O, Bessler C, Loening-Baucke V, Hale LP, Andree H, Weizenegger M, Holzl M, Scherer H, Lochs H. Spatial organization of microbiota in quiescent adenoiditis and tonsillitis. *J Clin Pathol* 60: 253-260, 2007.
153. Tavares W. Resistência bacteriana. In: Manual de antimicrobianos e quimioterápicos antiinfeciosos, Atheneu, 3ª Ed., São Paulo, p. 79, 2001.
154. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239, 1995.
155. Timon CI, Mcallister VA, Walsh M, Cafferkey MT. Changes in tonsillar bacteriology of recurrent acute tonsillitis: 1980 vs. 1989. *Respirat Med* 84: 395-400, 1990.
156. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, Mcdougall L, Bille J. New Mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 33 (11): 1869-1874, 1989.
157. Torretta S, Drago L, Marchisio P, Cappadonna M, Rinaldi V, Nazzari E, Pignataro L. Recurrences in chronic tonsillitis sustained by tonsillar biofilm-producing bacteria in children. Relationship with the grade of tonsillar hyperplasia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 77: 200-204, 2013.
158. Trabulsi LR, Alterthum F. *Staphylococcus aureus*. In: *Microbiologia*. Atheneu, São Paulo, p. 175-182, 2005.
159. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2: article 12, 2012.
160. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9: 978-984, 2003.

161. Weckx LLM, Weckx LY. Como diagnosticar e tratar amigdalites. *Rev Bras Med* 45: 27-32, 1988.
162. WHO. The World Medicines Situation 2011. Rational Use of Medicines. Geneva, World Health Organization 2011.
163. Witte W, Pasemann B, Cuny C. Detection of low-level oxacillin resistance in mecA-positive *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 13: 408-412, 2007.
164. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 577-585, 1995.
165. Williams JD. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 12: 3-7, 1999.
166. Winn JR W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1535p, 2006.
167. Zhao C, Liu Y, Zhao M, Liu Y, Yu Y, Chen H, Sun Q, Chen H, Jiang W, Liu Y, Han S, Xu Y, Chen M, Cao B, Wang H, Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infection in Beijing: high prevalence of PVL +ST398. *PLoS ONE* 7 (6): e38577, 2012.
168. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, Maletzki C, Kreikemeyer B, Pau HW, Podbielski A. Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS ONE* 5: e9452, 2010.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O RESPONSÁVEL LEGAL DE CRIANÇA PORTADORA DE AMÍDALITE CRÔNICA

Seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Dr^a Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga, sou o pesquisador responsável e minha área de atuação é Microbiologia. Após ler com atenção este documento ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar autorizar seu filho (a) a participar do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisador, em todas as folhas. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Dr Leandro Azevedo de Camargo (CRM/GO 6836) e Dra. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga (UFG/IPTSP). Telefones de contato: 3216-0000, 3209-6361. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 32 69 83 38 – 32 69 84 26 ou no endereço: 1^a Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

- Título: Caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos isolados de tonsilas de pacientes com faringite/tonsilite crônica.
- Pesquisador Responsável: Dr Leandro Azevedo de Camargo (CRM/GO 6836) e Dra. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga (UFG/IPTSP). Telefones de contato: 3216-0000; 3209-6361.
- Informações sobre quem está aplicando o termo de consentimento: O termo de consentimento será aplicado pelo médico do Hospital das Clínicas Dr. Leandro Azevedo de Camargo.
- Objetivos da pesquisa: A pesquisa tem o objetivo de estudar as bactérias presentes nas amígdalas de pacientes com infecção repetida de

Carla Braga

responsável será notificado, bem como o paciente, e então o médico tomará as devidas providências.

- Como tratamento alternativo para amigdalites tem-se o uso de antibióticos em quadro de infecções bacterianas agudas, uso de drogas antialérgicas em caso de alergias.
- Desconforto e risco esperados: Após a cirurgia poderá ocorrer: febre e dor - passam em 3 a 10 dias; mau-hálito – é comum ocorrer e desaparece em 7 a 14 dias; vômitos – podem ocorrer algumas vezes, no dia da cirurgia, com presença de sangue; sangramento – podendo ocorrer até 14 dias após a cirurgia, sendo mais frequente em menor volume e, mais raramente, em maior volume. Se necessário poderá ser realizado nova cirurgia e transfusão de sangue. A morte por hemorragia e anestesia pode ocorrer como em qualquer cirurgia, mas é rara.
- A participação no presente estudo não aumenta os riscos em relação à cirurgia, já que o paciente estará autorizando a pesquisa num material que já estará retirado do mesmo. Os riscos são próprios do procedimento cirúrgico e não da pesquisa. Sendo assim, não está previsto nenhum tipo de risco para você por participar desta pesquisa, desse modo, também, não está prevista nenhuma indenização, pois a tonsila retirada no ato cirúrgico independe de sua participação no estudo, visto ser uma indicação médica.
- Benefícios que poderão ser obtidos: Você não terá nenhum benefício direto, porém esta pesquisa vai ajudar a conhecer melhor as bactérias das amígdalas para orientar melhor o tratamento de outros pacientes. A pesquisa vai durar de agosto de 2011 a dezembro de 2013, o seu nome não será divulgado em momento nenhum. Você poderá retirar-se da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo.
- Não haverá qualquer despesa para o paciente devido à participação nesta pesquisa, nem haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação na pesquisa.
- A sua participação é de fundamental importância para a pesquisa, visto que o conhecimento sobre os microrganismos causadores de amigdalite repetida em nossa região dará apoio aos médicos para direcionar um melhor

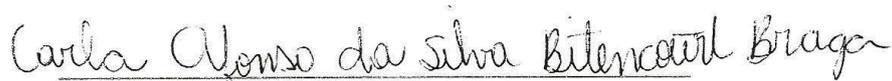
W. Braga

tratamento desta doença, possibilitando assim, futuramente, maior controle desta enfermidade.

- Todos os dados colhidos a respeito do paciente serão mantidos em sigilo absoluto sob a responsabilidade dos coordenadores do projeto, Dr. Leandro Azevedo de Camargo e Prof^a Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga.
- O paciente tem a inteira liberdade de não aceitar participar do projeto, bem como de retirar o consentimento, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual.
- Os coordenadores do projeto, Dr. Leandro Azevedo de Camargo e a Prof^a Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga, garantem que os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.
- Ao término do projeto, todos os participantes serão informados dos resultados obtidos.



Dr. Leandro Azevedo de Camargo



Prof^a Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DO (A) FILHO (A) COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,

_____, RG _____ CPF _____ nº de prontuário _____
nº de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em
permitir a participação do (a) meu (minha) filho (a)

_____ no estudo **Caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos isolados de tonsilas de pacientes com faringite/tonsilite crônica**, sob a responsabilidade do Dr. Leandro Azevedo de Camargo e da Profª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo Dr. Leandro Azevedo de Camargo sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Local e data

Nome e Assinatura do responsável:

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO 2

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
Comitê de Ética em Pesquisa



PROTOCOLO CEP/HC/UFV Nº 071/2011

Goiânia, 11/07/2011

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: *Prof. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga*
PESQUISADORES PARTICIPANTES: *Prof. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André, Prof. André Kipnis, Prof. Geraldo Sodoyama Leal, Msc. Leandro Azevedo de Camargo, Dr. Edson Júnior de Melo Fernandes, Ac. Danielle Isadora Blumenschein, Ac. Débora Fontoura Rodrigues, Ac. Kesia Cristina de Oliveira Batista.*

TÍTULO- *“Caracterização fenotípica e genotípica de micro-organismos isolados de tonsilas de pacientes com faringite/ tonsilite crônica”.*

Área Temática: *Grupo III*

Instituição Proponente: *IPTSP/UFV*

Local de realização: *Centro Cirúrgico/ SAMIS - HC/UFV*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa **analisou e aprovou** o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFV, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

O CEP/HC/UFV pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*).


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEP/HC/UFV