

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS SPP.* ISOLADOS DE TONSILAS DE PACIENTES COM FARINGITE/TONSILITE CRÔNICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS (HC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG).

Débora Fontoura RODRIGUES¹, Danielle Isadora BLUMENSCHHEIN², Késia Cristina de Oliveira BATISTA³, Edson de Melo FERNANDES⁴, Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges ANDRÉ⁵, Carla Afonso da Silva Bitencourt BRAGA⁶.

Endereço eletrônico: debrinhaufg@gmail.com¹

Palavras-chave: streptococcus, tonsilite crônica.

INTRODUÇÃO

Dentre as infecções do trato aéreo superior as faringites e tonsilites são as mais comuns, e estão entre os principais problemas de saúde das populações dos países desenvolvidos (DUARTE et al., 2007).

Cerca de 30 a 40% das faringoamigdalites agudas são de etiologia estreptocócica (VAN ELDERE, 2000; SANTOS & BEREZIN, 2005) e a importância desse fato deve-se à possibilidade de complicações não-supurativas tardias causadas por este agente patogênico, como por exemplo, a glomerulonefrite difusa aguda e a febre reumática, que representam 90% das indicações de cirurgia para troca de valvas cardíacas em crianças no Brasil (ATIK et al., 1999). Além disso, particularmente na população infantil, as tonsilites agudas representam uma grande fonte de transtornos sociais como perda de aulas, além da necessidade do uso de antimicrobianos repetidamente, e do potencial de complicações supurativas (WECKX & TEIXEIRA, 1997).

Revisado pelo orientador.

1. Bolsista PIVIC 2010-2011. Acadêmica do curso de Enfermagem/UFG.
2. Bolsista PIBIC 2010-2011. Acadêmica do curso de Medicina/UFG.
3. Bolsista PIVIC 2010-2011. Acadêmica do curso de Medicina/UFG.
4. Médico Residente do Hospital das Clínicas/UFG
5. Professora de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.
6. Orientadora. Professora de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG.

Diante da importância epidemiológica desse agente em tonsilites/faringites, faz-se necessário estudo que confirme sua importância em prevalência, subsidiando assim, maiores esforços a respeito do diagnóstico e tratamento desta patologia.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias do gênero *Streptococcus* de tonsilas extraídas de pacientes com faringite/tonsilite crônica atendidos no HC/UFG, além de determinar sua frequência na população em estudo.

Metodologia

1. Amostragem

Amostragem

A colheita de material ocorreu de acordo com a demanda espontânea de tonsilectomias do Setor de Clínica Cirúrgica do HC/UFG, no período de julho de 2010 a maio de 2011, tendo sido coletadas amostras de 51 indivíduos. Os pacientes tinham histórico de faringite/tonsilite crônica, em que o recurso indicado para o tratamento foi a tonsilectomia.

Após o procedimento cirúrgico, dois fragmentos de tonsilas, um do lado direito e outro do esquerdo, de cada paciente foram enviados em recipiente esterilizado, no período máximo de 10 horas, ao Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, onde foram processados.

Processamento do espécime clínico

Inicialmente as tonsilas foram pesadas para se estimar o peso das mesmas. Estas então foram transferidas para uma embalagem plástica esterilizada, na qual foi acrescentada água peptonada tamponada a 0,1%, na proporção de 1/10, resultando na diluição 10^{-1} .

Posteriormente, o recipiente foi homogeneizado em *stomacher* por dois minutos, do qual foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, sendo esta transferida para tubo contendo 4,5 mL de água peptonada, o que resultou na diluição 10^{-2} . Este tubo foi homogeneizado por 10 vezes e outra alíquota de 0,5 mL foi retirada e transferida para outro tubo contendo 4,5 mL da mesma solução (diluição 10^{-3}) e assim sucessivamente, até a diluição 10^{-5} .

Após este processo, 0,1 mL de cada diluição foi transferido para placa de Petri contendo ágar TSA (*Tripticase Soy Agar*), acrescido de 5% de sangue de cavalo (ágar sangue). Feita a semeadura, as placas foram incubadas em microaerofilia, a 37°C por 72 horas.

Isolamento bacteriano

As placas foram visualizadas e a diluição que permitiu o crescimento de colônias isoladas foi escolhida para a caracterização morfo-colonial, classificação do tipo de hemólise quando presente e isolamento em ágar sangue, o qual foi incubado a 37°C por 24 a 72 horas em microaerofilia.

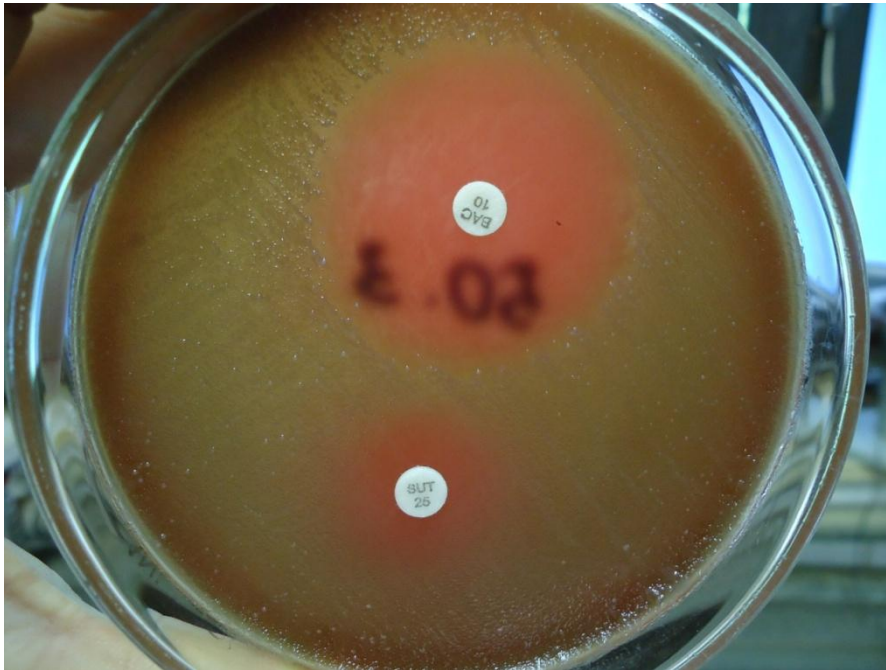
Identificação bacteriana

Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram para determinação da forma bacteriana e tipo de coloração e o teste para verificação da produção de catalase, a qual foi obtida colocando-se uma parte da amostra bacteriana em contato com o peróxido de hidrogênio. A presença de bolhas indica reação positiva.

Com a obtenção destes dados e segundo metodologia proposta por Stephen et al (2008) os seguintes testes foram realizados: crescimento em ágar bile-esculina, hidrólise de esculina e verificação da presença de resistência ou sensibilidade aos antibióticos sulfametoxazol-trimetoprim e bacitracina.

Os testes de resistência aos antibióticos sulfametoxazol-trimetoprim e bacitracina foram realizados diluindo-se as amostras em dois mililitros de solução salina a 0,9%, até que adquirissem uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de Mac-Farland. Com o uso de *swab* esterilizado a solução salina foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Müller-Hinton, acrescido de 5% de sangue de cavalo e, em seguida, incubadas a 37° C por 48h (Figura 1). Após o crescimento, os halos foram medidos em mm e os dados registrados.

Figura 1: Teste de antibiograma de amostra de *Streptococcus* alfa hemolítico com obtenção de halo de inibição de crescimento bacteriano frente aos antibióticos bacitracina e sulfametoxazol-trimetoprim.



Resultados

De um total de 51 tonsilas processadas e analisadas, foram obtidos 252 isolados bacterianos. Do total de 252 isolados pré-identificadas, foram encontradas 117 cepas de *Streptococcus*, segundos os testes de Gram e catalase (*Streptococcus spp*: cocos Gram positivo e catalase negativo), perfazendo um total de 46,42% das amostras obtidas. Das 117 amostras, 63 (53,85%) foram não-hemolíticas; 37 (31,62%) α -hemolíticas e 17 (14,53%) β -hemolíticas. Tais resultados estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos *Streptococcus* isolados de tonsilas de pacientes com tonsilite crônica de acordo com a produção de hemólise em ágar sangue.

Hemólise	Número de amostras	Percentual
<i>Não-hemolíticos</i>	63	53,85
<i>α-hemolíticos</i>	37	31,62
<i>β-hemolíticos</i>	17	14,53
Total	117	100

Das 117 amostras identificadas como *Streptococcus spp*, 56 amostras foram submetidas a testes e identificadas em grupos. A leitura dos testes teve como referência os dados mostrados no quadro 1 (Stephen et al., 2008).

Quadro 1: classificação de bactérias do gênero *Streptococcus* com relação ao padrão de hemólise, resistência ou sensibilidade frente aos antibióticos sulfametoxazol-trimetoprim e bacitracina, e presença de crescimento em ágar bile-esculina.

CLASSIFICAÇÃO	HEMÓLISE	SXT	BACITRACINA	BILESCULINA
<i>Grupo A</i>	β	R	S	negativo
<i>Grupo B</i>	β, nenhuma	R	R	negativo
<i>Grupo C, F ou G</i>	β	S	Variável	negativo
<i>Grupo D Enterococo</i>	α, β, nenhuma	R	R	positivo
<i>Grupo D Não - Enterococo</i>	α, β, nenhuma	S	R	Positivo
<i>Grupo Viridans</i>	α, nenhuma	S	Variável	Variável
<i>Pneumococos</i>	α	S	Variável	Negativo

S: sensível; R: resistente. SXT: antibiótico sulfametoxazol-trimetoprim

Dos 56 isolados submetidos aos testes citados, foram identificados 38 (67,86%) pertencentes ao grupo viridans, 3 (5,36%) *Streptococcus β- hemolíticos* do grupo A e 3 (5,36%) grupo C, F ou G. Doze isolados (21,42%) foram identificados somente em gênero

Streptococcus spp., uma vez que os testes propostos não permitiram sua total identificação. O resultado sumarizado pode ser conferido na tabela 2.

Tabela 2: Identificação das amostras de *Streptococcus* isoladas de pacientes com tonsilite recidivante.

Grupo	Número absoluto	Número relativo (%)
Grupo <i>viridans</i>	38	67,86
<i>Streptococcus spp.</i>	12	21,42
Grupo A	3	5,36
Grupo C, F ou G	3	5,36
Total	56	100

Discussão

A prevalência de *Streptococcus spp* nos espécimes clínicos mostra a importância dos *Streptococcus* na gênese da faringo-tonsilite crônica, seja como fator determinante ou oportunista. Quase metade das amostras (46,43%) isoladas foi identificada como sendo do gênero *Streptococcus*, provando que a prevalência desse agente nas tonsilas é de grande importância e pode determinar a escolha do tratamento. Não se pode afirmar, no entanto, que tais agentes são os responsáveis principais pela patogenia da faringo-tonsilite crônica ou se determinam a gravidade e a recidiva da doença, pois outras espécies bacterianas também foram isoladas dos mesmos pacientes.

Entretanto, nos resultados obtidos, ficou evidente que os *Streptococcus* não-hemolíticos juntamente com os α - hemolíticos são os micro-organismos mais prevalentes dentre os *Streptococcus spp*, além de outras bactérias também isoladas, o que caracteriza uma microbiota mista, como relatado também por Ejzenberg (2005). Este autor ressalta ainda a importância do *Streptococcus pyogenes* e outros estreptococos piogênicos nas tonsilites crônicas, tornando estes casos microbiologicamente semelhantes às tonsilites recorrentes.

Ao contrário das tonsilites agudas, em que a prevalência de *Streptococcus* β -hemolíticos é superior a qualquer outro agente bacteriano (TANAKA et al, 2009), somente foram isolados 5,36% de amostras de *Streptococcus* do Grupo A. *Streptococcus* α -hemolíticos

e não-hemolíticos totalizam 85,46% das amostras identificadas como *Streptococcus spp* e dentre esses, o Grupo viridans foi o que apresentou maior prevalência. Desse modo, este trabalho vai de encontro ao estudo de Bista et al. (2006) em que o *Streptococcus* do grupo *viridans* foi o agente mais comumente isolado de pacientes com tonsilas infectadas.

Quanto aos *Streptococcus* β -hemolíticos do Grupo A, cuja prevalência foi de 5,36%, o estudo mostrou dados semelhantes aos obtidos por Vieira et al. (2006), em que os resultados mostraram prevalência entre 5% e 10% desse grupo como colonizador da orofaringe de crianças. Como são micro-organismos mais virulentos, quando presentes podem contribuir para o agravamento do quadro infeccioso.

Conclusões

O trabalho destaca a importância dos *Streptococcus spp* na gênese da faringo-tonsilite crônica, uma vez que quase metade das amostras bacterianas analisadas foi composta por micro-organismos desse gênero. Outro destaque merece a baixa prevalência dos *Streptococcus* β -hemolíticos que nem sempre estão presentes nos quadros de tonsilite crônica. Nesse sentido, destacamos a importância de que mais estudos sejam desenhados a fim de determinar a microbiologia das tonsilites crônicas, uma vez que estudos acerca da microbiologia das tonsilites agudas são mais comuns.

O resultado deste trabalho gera o questionamento sobre quais agentes estão mais envolvidos na patogênese das tonsilites crônicas e se há diferença significativa entre a microbiologia de tonsilas provenientes de tonsilite aguda e tonsilas provenientes de tonsilite crônica. Se essa diferença for consistente, pode ser explicada a grande diferença entre a prevalência de grupos de *Streptococcus spp* analisados neste trabalho e o encontrado na literatura atual.

Outro fato é que a alta prevalência de *Streptococcus viridans* (67,85%) nas amostras analisadas pode indicar seu papel como patógeno oportunista nas tonsilites crônicas, visto que o mesmo é considerado como pertencente à microbiota normal. É perceptível que este agente deve ser estudado com maior rigor, no intuito de entender como as tonsilas são acometidas pelo agente residente e o que desencadeia a inflamação. Assim, poder-se-á compreender melhor como tal grupo bacteriano apresenta-se com uma prevalência tão significativa nestes casos.

Referências Bibliográficas

1. ATIK, F. A, DIAS, A. R, POMERANTZEFF, P. M, BARBERO-MARCIAL, M., STOLF, N. A., JATENE, A. D. Immediate and long term evolution of valve replacement in children less than 12 years old. **Arq Bras Cardiol.** v. 73, n. 5, p. 419-428, 1999.
2. BISTA, M., AMATYA, R. C. M., BASNET, P. Tonsillar microbial flora: A comparison of infected and noninfected Tonsils. **Kathmandu Univ. Med. J.**, v. 4, n. 1, p. 18-21, 2006.
3. DUARTE, H.N., SATO, F.R.L., MORAES, M. Pericoronarite e infecções das vias aéreas superiores: revisão. **Rev. Clín. Pesq. Odontol.** v. 3, n. 2, p. 125-132, 2007.
4. EJZENBERG, B. Diagnóstico e conduta na tonsilite crônica. **Pediatria**, v. 27, n. 4, p. 267-273, 2005.
5. STEPHEN D. ALLEN WILLIAM M. JANDA PAUL C. SCHRECKENBERGER WASHINGTON C. WINN. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.
6. TANAKA, I. I., IWAMOTO, A. H., PERSON, O. C. Amigdalite aguda letal causada por *Streptococcus pyogenes*. **O M u n d O d a S a ú d e**, v. 33, n. 1, p. 114-117, 2009.
7. VAN ELDERE, J. The role of bacteria as a local defence mechanism in the ear, nose and throat. **Acta Otol Belg.**, v. 54, p. 243-247, 2000.
8. VIEIRA, F. M. J.; FIGUEIREDO, C. R.; SOARES, M. C.; WECKX, L. Y., SANTOS, O.; MAGALHÃES, G.; ORLANDI, P.; WECKX, L. L. M.; PIGNATARI, S. Prevalência de *Streptococcus pyogenes* em orofaringe de crianças que frequentam creches: estudo comparativo entre diferentes regiões do país. **Rev. Bras. Otorrinol.**, v. 72, n. 5, p. 587-591, 2006.
9. WECKX, L. L. M., TEIXEIRA, M. S. Amigdalites: aspectos imunológicos, microbiológicos e terapêuticos. **JBM**, v. 73, n. 5 e 6, p. 118-123, 1997.