

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PEDRO GIMENES GRANDIN FILHO

**AGENTES ETIOLÓGICOS DE FARINGOTONSILITES AGUDAS EM
PACIENTES ADULTOS DE SÃO CARLOS**

São Carlos, SP - 2023

PEDRO GIMENES GRANDIN FILHO

**AGENTES ETIOLÓGICOS DE FARINGOTONSILITES AGUDAS EM
PACIENTES ADULTOS DE SÃO CARLOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Departamento de Medicina da
Universidade Federal de São Carlos como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Médico.

Orientador pedagógico: Prof. Dr. Cláudio Ricardo
de Oliveira

Orientadoras científicas:

- Prof.^a Dr.^a Kate Cristina Blanco (IFSC - USP)
- Prof.^a Dr.^a Sigrid De Sousa dos Santos (UFSCar)

São Carlos, SP - 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque foi necessário ter fé para acreditar que chegaria até aqui.

À minha família, que primeiro me ensinou a olhar as pessoas com amor. À minha mãe, Aparecida, que todos os dias pedia por mim e de quem herdei muito do que sou hoje. Ao meu pai, Pedro, pelas noites incansáveis de trabalho nas estradas. Ao meu irmão, Daniel, por ser o irmão mais velho que eu não saberia pedir.

Aos meus amigos Laura, Aurora, Yuji, Maria Beatriz, Daniel, Carol, Caio, Kin e Igor por me acolherem e por serem as melhores companhias durante os seis anos ou boa parte deles.

Ao Gabriel, com você aprendi o significado de coragem, admiração e resistência.

À Nathália, por ser uma irmã mais velha e dividir tudo que a gente chamou de lar nos últimos 6 anos. Com você aprendi o verdadeiro significado de amizade.

Aos professores e preceptores pela paciência e dedicação. Com vocês vi e vivi os momentos mais emocionantes da minha vida. Por serem uma lembrança constante de que cuidamos de seres humanos e por me ensinarem a entender um pouco melhor a complexidade por trás de cada história. Agradecimento especial à Profa. Sigrid e à Kate pelas horas despendidas com este trabalho e sua orientação, além das horas dos momentos na coleta de dados. Ao Prof. Cláudio Ricardo pelas orientações durante os anos de graduação.

Aos pacientes e colegas de turma que compartilharam suas experiências e compreensões sobre a medicina direta ou indiretamente.

À vida e suas experiências diárias, sua finitude e sua beleza. Todos os dias valeram a pena.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo - **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC-CNPq)** pelo apoio financeiro (bolsas de PGGF).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo financiamento da pesquisa (FAPESP: CEPOF Grant nº 13/07276-1).

À **Kate Cristina Blanco, Sigrid De Sousa dos Santos e Vanderlei Salvador Bagnato - IFSC - Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realizar minha iniciação científica com parte do Estudo **“TRATAMENTO DE FARINGOTONSILITES COM AÇÃO FOTODINÂMICA”**

À **Giannina Ricci e Angela Satie Nishikaku (Biomolricci)** pela realização do PCR para *Fusobacterium necrophorum*

À **Natalia Sardellae e equipe do Laboratório de Microbiologia da Unimed São Carlos** pelo suporte na investigação bacteriológica.

Ao **Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha** e ao **M.^e João Pedro Mais de Oliveira da Silva** pela aprendizagem e realização do PCR para vírus respiratórios no **Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada - UFSCar**.

Ao colega **Daniel Basile Velloso de Oliveira** que participou comigo do estudo **“TRATAMENTO DE FARINGOTONSILITES COM AÇÃO FOTODINÂMICA”**.

À **Irmadade Santa Casa de São Carlos** pela nossa acolhida durante o período de estudo.

Resumo

Introdução: A faringite é uma infecção muito frequente do trato respiratório, podendo ser causadas por bactérias, vírus e fungos. Desconhece-se os agentes etiológicos implicados na etiologia das faringotonsilites agudas em nosso meio. **Objetivo:** O presente projeto teve como objetivo investigar a etiologia das faringotonsilites agudas como parte de projeto de pesquisa de uso de terapia fotodinâmica no tratamento de faringotonsilites agudas.

Casuística e métodos: Os pacientes maiores de 18 anos com faringotonsilite aguda confirmada por avaliação clínica eram incluídos no estudo de terapia fotodinâmica caso assinassem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A investigação etiológica do protocolo incluiu coleta de swab de orofaringe para teste rápido para EBHGA; coloração de Gram e cultura geral em ágar sangue, chocolate e Mac Conkey; reação em cadeia por polimerase (PCR) para *Fusobacterium necrophorum* e painel de detecção de vírus respiratórios por reação em cadeia por polimerase (vírus influenza A e B, adenovírus, rinovírus, coronavírus OC43, vírus Epstein-Barr, herpes simplex vírus, e coronavírus-19).

Resultados preliminares: De 20 e maio de 2019 a 29/01/2020 foram incluídos no estudo 47 pacientes com faringotonsilite aguda, sendo 53,2% do sexo masculino, com idade média de 23,6 anos. A etiologia foi bacteriana em 20 pacientes (42,6%), viral em sete pacientes (14,9%), e mista – bacteriana e viral em 5 pacientes (10,6%). O EBHGA foi responsável por 25,5% dos casos, o *Fusobacterium necrophorum* 10,6%, e EBHGB por 4,3% e o *Staphylococcus aureus* por 4,3%. Em relação aos vírus, o HSV foi responsável por 8% dos casos, e o EBV por 4,3%. Todos os isolados de *Streptococcus* beta-hemolítico Grupo A eram sensíveis à penicilina, entre 55 e 60% eram resistentes aos macrolídeos e 50% eram resistentes à clindamicina.

Palavras-chave: Faringotonsilite; etiologia; EBHGA; *Fusobacterium necrophorum*; vírus

Abstract

Introduction: Pharyngitis is a very common infection of the therapeutic tract and can be caused by bacteria, viruses and fungi. The etiological agents involved in the etiology of acute pharyngotonsillitis in our environment are unknown. **Objective:** This project aimed to investigate the etiology of acute pharyngotonsillitis as part of a research project on the use of photodynamic therapy in the treatment of acute pharyngotonsillitis. **Patients and methods:** Patients over 18 years of age with acute sore throat confirmed by clinical assessment were included in the photodynamic therapy study if they signed an informed consent form. The etiological investigation of the protocol included collection of oropharyngeal swab for rapid test for Group A beta-hemolytic *Streptococcus*; Gram stains and general culture on blood, chocolate, and Mac Conkey agar; polymerase chain reaction (PCR) for *Fusobacterium necrophorum* and detection panel of virus detection by polymerase chain reaction (influenza A and B virus, adenovirus, rhinovirus, OC43 coronavirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus, and coronavirus -19). **Preliminary results:** From May 20, 2019 to January 29, 2020, 47 patients with acute pharyngotonsillitis were included in the study, 53.2% male, with a mean age of 23.6 years. The etiology was bacterial in 20 patients (42.6%), viral in seven patients (14.9%), and mixed – bacterial and viral in 5 patients (10.6%). GAS was responsible for 25.5% of cases, *Fusobacterium necrophorum* for 10.6%, and GBS for 4.3% and *Staphylococcus aureus* for 4.3%. Regarding viruses, HSV was responsible for 8% of cases, and EBV for 4.3%. All isolates of Group A beta-hemolytic *Streptococcus* were sensitive to penicillin, between 55 and 60% were resistant to macrolides and 50% were resistant to clindamycin.

Keywords: Pharyngotonsillitis; etiology; GAS; *Fusobacterium necrophorum*; virus

SUMÁRIO

Sumário

AGRADECIMENTOS	3
Resumo.....	5
Abstract.....	6
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	8
1. Introdução	10
1.1 Faringotonsilites bacterianas	11
1.1.1 Características clínicas	11
1.1.2 Estreptococos beta-hemolítico do grupo A.....	13
1.1.2.1 Diagnósticos laboratorial.....	14
1.1.2.2 Tratamento antimicrobiano	17
1.2 Faringotonsilites virais	19
2. Objetivo.....	20
3. Casuística e Métodos	21
3.1 População	21
3.2 Aspectos Éticos.....	22
3.3 Critérios de Inclusão	22
3.4 Critérios de Exclusão	22
3.5 Avaliação de entrada	22
3.6 Coleta do Material.....	22
3.7. PCR para <i>Fusobacterium necrophorum</i> e EBGHGA.....	24
3.7.1 Extração de DNA.....	24
3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	24
3.7.3 Eletroforese em gel de agarose.....	26
3.7.4 Reação de sequenciamento de DNA	26
3.8. PCR para vírus.....	29
4. Resultados Preliminares	30
5. Conclusões	34
6. ANEXO I. AUTOAVALIAÇÃO.....	35
7. ANEXO II. AVALIAÇÃO DO ORIENTADOR PEDAGÓGICO.....	36
8. Referências Bibliográficas	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CAAE	Cerrtificado de Apresentação de Apreciação Ética
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
EBHGA	Streptococcus pyogenes ou Estreptococo b-hemolítico do grupo A
Fn	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
FT	Faringotonsilites
LED	Light-Emiting Diode
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDT	Photodynamic Therapy
PS	Photosensitizer
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SMU	Serviço Médico de Urgência
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

"Everyone succumbs to finitude. I suspect I am not the only one who reaches this pluperfect state. Most ambitions are either achieved or abandoned; either way, they belong to the past. The future, instead of the ladder toward the goals of life, flattens out into a perpetual present. Money, status, all the vanities the preacher of Ecclesiastes described hold so little interest: a chasing after wind, indeed."

(Paul Kalanithi)

1. Introdução

Nas últimas duas décadas, temos assistido à emergência e disseminação de bactérias resistentes a múltiplos agentes antibacterianos, causadas por diversos fatores incluindo uso indiscriminado de antibióticos na saúde humana e na atividade agropecuária, indisponibilidade de diagnóstico etiológico seguro e medicações falsas ou sem controle de qualidade.¹ Bactérias multirresistentes são consideradas atualmente como doença mundial emergente e importante problema de saúde pública. São então necessários esforços coordenados para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas, além de novos agentes antimicrobianos.²

O principal agente etiológico da faringotonsilite é o *Streptococcus pyogenes*, que pode causar complicações supurativas e não supurativas.^{3; 4;} ⁵No entanto, diversos agentes podem causar faringotonsilites em adultos e adolescentes, muito embora as tonsilas palatinas apresentem colonização bacteriana composta por uma flora variável, incluindo anaeróbios e aeróbios (por exemplo, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Prevotella sp*, *Bacteróides fragilis* e *Fusobacterium sp*). A principal causa de faringitotonsilite é o *Streptococcus pyogenes*, um estreptococo β -hemolítico do grupo A de Lancefield (EBHGA). A frequência relativa de cada microorganismo depende da idade, da região geográfica e da época do ano em que incidem. A Tabela 1 resume a distribuição dos agentes mais implicados na etiologia das faringotonsilites agudas em adultos e adolescentes.

Tabela 1. Agentes etiológicos de faringotonsilite agudas em adultos e adolescentes

Etiologia	Frequência	Referências
EBHGA	10,3 - 30%	Centor et al., 2015 ⁶ Atkinson et al., 2018 ⁷ Aliyu et al., 2004 ⁸
Outros estreptococos beta hemolíticos	9%	Centor et al., 2015 ⁶
- <i>Streptococcus</i> grupo C	3 – 3,6%	Aliyu et al., 2004 ⁸
- <i>Streptococcus</i> grupo G	2 – 3,2%	Hedin et al., 2014 ⁹
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (Fn)	10 - 21,5%	Aliyu et al., 2004 ⁸ Atkinson et al., 2018 ⁷
<i>M. pneumoniae</i>	1,8 - 1,9%	Centor et al., 2015 ^{6;10}
<i>N. gonorrhoeae</i>	0,1 – 3 % 5,1% (HSH)	Morris et al., 2006 ¹¹ Hedin et al., 2014 ⁹
Vírus		
- Influenza A	1,8%	
- Influenza B	7,3%	
- Rhinovírus	6,4%	
- Enterovírus	0,5%	
- Coronavírus humano	5,9%	
- Parainfluenza	0,5%	
- Vírus respiratório sincicial	1,8%	
- Metapneumovírus	1,8%	
- Adenovírus	4,1%	
- Epstein Barr vírus	5,0%	

1.1 Faringotonsilites bacterianas

1.1.1 Características clínicas

O diagnóstico clínico de provável faringotonsilite de etiologia bacteriana pode ajudar o tratamento adequado e a prevenção de complicações. No entanto, não há sinal ou sintoma clínico que isoladamente identifique a faringotonsilite bacteriana com precisão^{12;}
13;14.

O EBHGA é responsável por 16 a 40% dos casos de faringotonsilites em crianças e

em 5 a 15% em adultos^{15; 16; 17; 18}. Em pacientes com dor em faringe, a presença de exantema escarlatiniforme, petéquias palatais, exsudato de orofaringe, vômitos e nódulos cervicais aumentam a probabilidade de etiologia estreptocócica da faringite¹⁴.

O diagnóstico etiológico da faringite estreptocócica depende de detecção do agente por métodos laboratoriais. No entanto, sistemas de pontuação clínicos podem ser utilizados para prever o risco de infecção por EBHGA em locais com precárias condições de atendimento. O sistema de pontuação mais comumente utilizado é o Centor, onde a probabilidade de doença por EBHGA baseia-se na presença dos seguintes fatores: febre acima de 38°C, ausência de tosse, adenomegalia cervical anterior dolorosa, hipertrofia ou exsudato em tonsilas palatinas, e idade entre 3 e 14 anos. A probabilidade aumenta de acordo com a pontuação (1-5), variando de 1-2,5% até mais de 50%^{19;20; 21}. Há ampla sobreposição entre sinais e sintomas da faringite estreptocócica e não estreptocócica, geralmente de etiologia viral, e a capacidade de se diagnosticar com exatidão a faringite estreptocócica com base apenas em critérios clínicos é baixa. Assim, a menos que estejam evidentes características clínicas e epidemiológicas de infecção viral, deve-se utilizar critério laboratorial para determinar se a infecção é causada por EBHGA¹².

O pico da incidência de faringite de *S. pyogenes* ocorre em crianças de 5 a 15 anos de idade²². O período mais comum acontece durante o inverno e o início da primavera em países de climas temperados. Surtos podem ocorrer em famílias, escolas, creches, instalações militares e outras coletividades em que há o contato fechado de humano para humano. Não existe, além dos seres humanos, nenhum hospedeiro animal ou reservatório ambiental natural para o *S. pyogenes*, o que torna a fonte de infecção humana o contato direto ou indireto com uma pessoa infectada.

A transmissão ocorre principalmente por gotículas de saliva ou secreções respiratórias, e ainda, objetos e alimentos como rotas alternativas de transmissão do *S. pyogenes*²³. A grande preocupação dos profissionais da área da saúde da criança e do adolescente é a possibilidade do desenvolvimento das complicações tardias, supurativas e não supurativas que o *Streptococcus pyogenes*, microorganismo beta hemolítico classificado no grupo A de Lancefield (EBHGA) pode causar^{12; 17; 24; 25}.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, anualmente ocorrem cerca de 600 milhões de novos casos de faringotonsilites por EBHGA e destes 500 mil podem evoluir com febre reumática (FR) e cerca de 300 mil com cardite reumática (CR). Em países em desenvolvimento, a ocorrência é três vezes maior do que em países desenvolvidos²⁶. O diagnóstico e tratamento inadequado de tonsilites e faringites é causa comum do uso

inapropriado de antibióticos²⁷.

Em adultos, além do EBGA, ganha importância etiológica nas faringotonsilites o *Fusobacterium necrophorum* (Fn), bacilo Gram negativo anaeróbio, associado à tromboflebite séptica da veia jugular interna ou síndrome de Lemierre, que evolui muito frequentemente com embolia séptica pulmonar. O Fn chega a ser responsável por 10 a 21,5% das faringites e tonsilites em adolescentes e adultos^{6; 7; 8}

Outra etiologia que ganha maior proporção como causa de faringotonsilite na população adulta é a gonorreia, particularmente em homens que fazem sexo com homens, nos quais o agente chega a ser responsável por 5,1% dos casos¹¹.

1.1.2 Estreptococos beta-hemolítico do grupo A

Os estreptococos são bactérias Gram-positivas, geralmente imóveis, não esporuladas, com formato esférico de menos de 2 µm. Formam habitualmente cadeias ou pares. Algumas espécies possuem cápsula, metabolismo fermentativo de açúcares que formam principalmente ácido láctico. São aeróbios e anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativos, lábeis ao aquecimento por 30 minutos a 60°C. Causam uma série de enfermidades nos animais e no homem, sendo importantes saprófitas do leite e produtos lácteos. Estão presentes na pele e mucosas do trato digestivo, genital e respiratório, podendo em determinadas condições, causar doença²⁸.

Os fatores de virulência mais conhecidos dos estreptococos são: cápsula de ácido hialurônico; proteína M antifagocitária e exotoxinas pirogênicas. Outras moléculas incluindo estreptolisinas, proteases, toxinas leucocidas, ativadores de plasminogênio (estreptoquinase) e possivelmente receptores da plasmina encontrados na superfície ou secretados contribuem com a patogenicidade. A maioria dos estreptococos patogênicos possuem também a habilidade de ligar-se ao plasma do hospedeiro; à albumina, à imunoglobulina, ao fibrinogênio. Produzem hemolisinas e são classificados de acordo com o padrão hemolítico em ágar sangue: alfa, beta e gama²⁹.

As espécies de estreptococos β-hemolíticos são classificadas de acordo com o agrupamento de Lancefield, que utiliza reação sorológica de aglutinação contra os carboidratos da parede celular. Os estreptococos β-hemolíticos são dispostos em vinte grupos A-U sem I e J (isto A a H e K a V)^{28; 29}.

OS EBHGA produzem um grande número de proteínas que são secretadas no fluido extracelular durante o crescimento. Os primeiros produtos extracelulares descobertos estavam associados às características clínicas da infecção; como a toxina eritrogênica, a

estreptolisina O, a estreptolisina S, a protease, a estreptoquinase, a DNase, a RNase e a hialuronidase³⁰. Posteriormente outros produtos extracelulares foram descobertos, como fator inibidor do complemento, proteínas estreptocócicas imunogênicas secretadas e alguns superantígenos. Além disso, estas proteínas secretadas podem ser codificadas por genes cromossômicos ou associadas ao bacteriófago. Muitas destas proteínas secretadas são conhecidas como fatores de virulência e desempenham um papel importante na colonização, invasão, dispersão e patogênese da doença por EBHGA^{31; 32; 33}.

1.1.2.1 Diagnósticos laboratorial

O diagnóstico de infecção por EBHGA deve preferencialmente ser confirmado microbiologicamente por testes rápidos de detecção de antígenos (TRDA) e/ou através de cultura de secreção de orofaringe. O padrão-ouro para o diagnóstico de infecções da orofaringe pelo EBHGA é a cultura^{34; 35}, que deve ser feita antes de se iniciar o tratamento com antibióticos¹². As amostras clínicas devem ser semeadas em placas de ágar-sangue, o que possibilita um rastreio preliminar de colônias β -hemolíticas. Posterior confirmação de colônias suspeitas como EBHGA pode ser obtido por vários testes de laboratório, fácil e rapidamente realizados e que ainda são amplamente aplicados na microbiologia clínica, apesar da crescente utilização de sistemas de identificação automática. O EBHGA pode ser agente colonizador de orofaringe. Dessa forma, a investigação microbiológica deve ser guiada por fatores clínico-epidemiológicos: idade do paciente, sinais e sintomas clínicos, estação do ano e exposição pessoal ao EBHGA^{34; 36}.

O uso de TRDA no pronto-atendimento de pacientes com faringotonsilite possibilita diagnóstico específico e instituição precoce de antibioticoterapia. Os TRDA geralmente utilizam a detecção de antígeno de hidrato de carbono específico do grupo A em esfregaços da orofaringe por métodos de aglutinação e por outros imunoenaios. A lista de testes aprovados pela FDA é acessível on-line (Departamento de Saúde e Serviços Humanos, 2015 EUA). Os TRDA têm especificidade de cerca de 95% e a sensibilidade de 55 a 90%^{12; 34; 37}. Dessa forma, TRDA negativo não exclui totalmente a infecção por EBHGA. Dessa forma, recomenda-se que seja realizada cultura de orofaringe particularmente para pacientes com TRDA negativo^{12; 38; 39}. A especificidade dos TRDA é geralmente elevada, embora os resultados falso-positivos podem ocorrer em de pacientes previamente diagnosticados ou tratados⁴⁰ ou em pacientes colonizados com espécie de estreptococos *não-S. pyogenes* que carregam o grupo Lancefield.

Os estreptococos são geralmente cultivados em meios de ágar suplementados com sangue. Esta técnica permite a detecção de β -hemólise, importante para os passos

subsequentes de identificação, pois, aumenta o crescimento de estreptococos pela adição de uma fonte externa de catalase. Os meios seletivos para a cultura de bactérias Gram-positivas (tal como meios de ágar que contém álcool feniletílico, ou ágar de Columbia com colistina e ácido nalidíxico) também proporcionam condições de cultura adequadas para o *S. pyogenes*; condições ótimas de incubação para a grande maioria das estirpes de estreptococos incluem um intervalo de temperatura de 35°C a 37°C na presença de 5% de CO₂, ou sob condições anaeróbias. Estas condições são otimizadas para a cultura de espécies de estreptococos que pertencem ao grupo *viridans*, mas podem não ser ideais para o crescimento de EBHGA^{41; 42}.

Após a detecção de colônias β-hemolítica mostrando uma típica morfologia de *S. pyogenes*, um teste catalase confirma que a espécie isolada representa um Estreptococo. Alguns testes de laboratório realizados rapidamente podem então ser aplicados para a identificação definitiva de espécies. Cada um dos testes, que são detalhados abaixo, tem algumas limitações; resultados mais confiáveis de identificação podem ser alcançados através da combinação de dois dos métodos.

Atualmente há diferentes kits comerciais para a classificação dos estreptococos β-hemolíticos nos grupos de Lancefield⁴³, sendo amplamente aplicados em laboratórios de microbiologia. Proporcionam substratos para a extração rápida do antígeno e subsequente aglutinação por anticorpos específicos; são tipicamente dirigidos para antígenos Lancefield A, B, C, F, e G. Apesar de existir uma boa correlação entre a presença de certos antígenos Lancefield com espécies específicas de estreptococos, esta não é de 100% no caso dos antígenos do grupo Lancefield A, C, ou G. Exceto para raras mutações, todas as estirpes de *S. pyogenes* abrigam o antígeno Lancefield do grupo A na sua superfície, mas essa presença não se limita ao *S.pyogenes*. Também tem sido encontrada em espécies de *Streptococcus* do grupo *anginosus*, bem como em raros *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolados⁴². Portanto, a detecção do grupo Lancefield exige mais testes para um diagnóstico confiável de espécies de *S. pyogenes*, o que pode ser conseguido por discos de sensibilidade à bacitracina ou um teste de determinação PYR.

O teste PYR é um método colorimétrico rápido, muitas vezes utilizado para distinguir *S. pyogenes* a partir de outros estreptococos β-hemolíticos com morfologia semelhante (tal como *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) e testa a presença da enzima pirrolidonil aminopeptidase. Esta enzima hidrolisa a L-pirrolidonil β-naftilamida (PYR) em β -naftilamida, que produz uma cor vermelha quando um reagente cinamaldeído é adicionado. O teste pode ser realizado em tiras de papel que contêm substratos cromogénicos

desidratados para a pirrolidonil aminopeptidase em poucos minutos³⁸. Para evitar possíveis erros de identificação, é importante distinguir o *Streptococcus* do *Enterococcus* antes do teste PYR e se ter em mente que espécies e estirpes de outros gêneros estreitamente relacionados podem ser PYR-positivo (incluindo os gêneros *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Staphylococcus*, e *Lactococcus*). Os Enterococos apresentam β -hemólise e são ocasionalmente encontrados em placas de ágar-sangue. No entanto, Enterococos PYR-positivo β -hemolíticos isolados exibem uma morfologia colonial diferente e, quando combinados com outras características fenotípicas, são facilmente distinguidos dos Estreptococos. Para evitar reações falsos positivas causadas por outras espécies bacterianas PYR-positivas, as quais podem estar presentes em culturas mistas, este teste deve ser realizado apenas em culturas puras⁴².

O EBHGA também pode ser diferenciado de outros estreptococos pelo aumento da sua sensibilidade à bacitracina. Este teste, juntamente com o antígeno Lancefield, é utilizado para maior especificidade na identificação do *S. pyogenes* de outras cepas de estreptococos β -hemolíticos que são PYR positivos que podem conter um antígeno grupo A resistente à bacitracina, tais como *S. iniae* e *S. porcinus*. Para executar um teste de sensibilidade à bacitracina, é importante fazer uma subcultura da estirpe a ser testada em uma placa de ágar-sangue de carneiro (SBA), uma vez que ao se colocar o disco de Bacitracina numa placa principal poderia observar-se resultados variáveis. Após a incubação durante a noite a 35°C em 5% de CO², uma zona de inibição em torno do disco indica a sensibilidade da estirpe. Cepas de *S. pyogenes* resistentes à bacitracina têm sido observadas em países europeus⁴⁴.

Sistemas automatizados de identificação bacteriana ganharam cada vez mais importância no laboratório clínico⁴⁵. Atualmente, uma variedade de produtos que incorporam baterias de testes está comercialmente disponíveis para a identificação de espécies de estreptococos. Esses produtos geralmente apresentam um bom desempenho com estreptococos patogênicos comumente isolados, como *S. pyogenes*, com maior rapidez⁴⁶. Sistemas comerciais para a identificação de estreptococos encontram-se disponíveis para a identificação direta de patógenos bacterianos de balões de hemocultura^{47; 48}. Resultados altamente favoráveis na aplicação destes sistemas têm sido obtidos para os principais patógenos bacterianos, incluindo *S. pyogenes* e *S. agalactiae*.

A identificação direta de *S. pyogenes* a partir da hemocultura permite a rápida administração de antibioticoterapia adequada, vantagem considerável para os pacientes que sofrem de doenças invasivas que ameaçam a vida. No entanto, para a maioria dos *S.*

pyogenes isolados em laboratório, os testes microbiológicos convencionais ainda oferecem uma alternativa aceitável e de baixo custo²⁹.

Atualmente dispomos de tecnologia molecular para detecção de sequências de material genético do *S. pyogenes* diretamente em secreção de orofaringe. O teste EBGADirect identifica sequências de RNA específicas de *S. pyogenes* por sonda quimioluminescente de ácido nucleico de cadeia simples^{49; 50}. O ensaio tem bom desempenho em comparação com métodos de cultura de estreptococos, com sensibilidade e especificidade de 89% a 95% e de 98% a 100%, respectivamente^{40; 49; 50; 51}

Recentemente, método comercial de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção direta de DNA *S. pyogenes* em secreção de orofaringe passou a ser disponível, com excelente sensibilidade (99%) e especificidade (99,6%)⁵². Também foram desenvolvidos métodos de detecção automatizada de DNA de *S. pyogenes* em esfregaços de orofaringe, com diagnóstico dentro de 20 minutos²⁹.

O diagnóstico de complicações não supurativas das infecções estreptocócicas, como a febre reumática ou glomerulonefrite, pode ser facilitado pela detecção de anticorpos específicos contra o estreptococo. As provas sorológicas não são úteis nas infecções agudas, pois os anticorpos são detectáveis apenas de uma a duas semanas após o início da infecção aguda por *S. pyogenes*⁵². Vários fatores influenciam a produção de anticorpos: local da infecção, tempo desde o início dos sintomas, idade do paciente, a prevalência das infecções estreptocócicas em uma região particular, mudanças sazonais e comorbidades do paciente. Os anticorpos mais utilizados para o diagnóstico de doenças pós-estreptocócica são anti-estreptolisina O (ASLO) e anti-DNase B²⁹.

Títulos de anti-DNase B tendem a permanecer elevados mais do que os títulos de ASLO e são mais confiáveis para a confirmação de infecção estreptocócica anterior. Apenas 80-85% dos pacientes com febre reumática apresentará títulos elevados de ASLO, os títulos de DNase adicionais podem ser úteis. Como a presença de anticorpos anti-DNase B é mais específica para *S. pyogenes* e não presente em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, o aumento dos níveis de ASLO, sem alterações nos títulos B anti-DNase pode indicar infecções por *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. O ensaio anti-DNase B clássico é um ensaio de neutralização, e baseia-se na inibição da atividade da nuclease através de anticorpos presentes no soro do doente. Outras técnicas disponíveis incluem teste de aglutinação em látex.²⁹

1.1.2.2 Tratamento antimicrobiano

O diagnóstico rápido das faringotonsilites agudas permite início precoce de

antibioticoterapia, reduzindo morbidade, complicações e a transmissão. A Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia e a maioria das sociedades médicas internacionais recomendam investigação microbiológica das faringotonsilites agudas com o uso de teste rápido para detecção de antígeno (TRDA) ou DNA do EBHGA para a decisão terapêutica. Em caso de teste rápido reagente recomenda-se início imediato de antibioticoterapia. Em caso de teste rápido para a detecção de antígeno negativo, a recomendação é que não seja iniciada antibioticoterapia e a conduta seja revista após resultado da cultura. Nem todas as sociedades médicas recomendar rotineiramente a cultura.^{53; 54}

A penicilina é a droga de escolha para o tratamento empírico de infecções por *S. pyogenes*, apesar de mais de 60 anos de uso. O *S. pyogenes* se mantém sensível à penicilina e testes de resistência para penicilinas ou outros beta-lactâmicos aprovados para seu tratamento não são necessários. No entanto, mais de 10% dos pacientes referem alergia à penicilina, o que leva ao uso de cefalosporinas, clindamicina ou macrolídeos como tratamentos alternativos.^{53; 54} Como as taxas de resistência a macrolídeos entre *S. pyogenes* isolados vem aumentando na América do Norte bem como na Europa, testes de resistência para estas substâncias podem ser indicados⁵⁵. A resposta ao tratamento antimicrobiano não é rápida, havendo risco relativo de manutenção da dor na orofaringe de 0,66 no terceiro dia de tratamento e de 0,18 no sétimo dia de tratamento⁵⁶.

Recentemente foi iniciada campanha pelo Ministério da Saúde da Inglaterra (National Institute for Health and Care Excellence, 2017), incorporada por todo o Reino Unido, para incentivar o não uso de antibióticos em faringotonsilites agudas. Para isso foi elaborado documento com revisão sistemática de todas possíveis estratégias para tratamento das faringites agudas. O documento chama a atenção para o fato de apenas 20% das faringotonsilites serem causadas por EBGA e que, no entanto 60% receberem tratamento antibioticoterápico, portanto tratamento antimicrobiano excessivo. Na extensa revisão, várias estratégias são aventadas para tentar diminuir o uso de antibióticos, desde a restrição aos pacientes com pontuação Centor maior que três associada a graves condições clínicas (sepse, desidratação e abscesso peritonsilar) e comorbidades (cardiopatias, pneumopatia, insuficiência renal, insuficiência hepática, doença neuromuscular, fibrose cística e prematuridade), até restrição apenas aos pacientes com teste rápido reagente. A revisão está disponível livremente na internet (<https://www.nice.org.uk/guidance/gidapg10000/documents/evidence-review>) e motivou campanha também na imprensa leiga (Mais descanso e menos antibiótico: a receita para evitar superbactérias -<http://www.bbc.com/portuguese/geral-41909940?SThisFB>).

1.2 Faringotonsilites virais

Assim como em crianças, os vírus podem ser causa importante de faringotonsilites em adultos⁹, podendo levar ao uso inapropriado, excessivo de antimicrobianos. O início gradual do quadro, a ausência de exsudato em tonsilas ou de adenomegalia satélite, e a presença de rinorréia, rouquidão, conjuntivite ou tosse aumentam a probabilidade de etiologia viral⁵⁷. Os principais vírus implicados na etiologia de faringites e faringotonsilites em adultos e adolescentes estão listados na Tabela 1.

A suspeita diagnóstica clínica de faringotonsilite de etiologia viral não exclui a possibilidade de faringotonsilite estreptocócica, por Fn ou por gonococo. O ideal é que o diagnóstico seja confirmado pela negatividade no teste rápido para antígenos estreptocócicos (TRDA), pela ausência de história epidemiológica para gonococo, e posteriormente pela ausência de crescimento bacteriano na cultura de secreção de orofaringe. Não está indicada pesquisa de etiologia viral de rotina. No caso de suspeita clínica de mononucleose infecciosa, pode-se realizar sorologia para EBV, sendo de especial valia a pesquisa de IgM e IgG contra antígenos do capsideo viral (anti-VCA)⁵⁸.

O tratamento da dor e dos sintomas sistêmicos associados às faringites e faringotonsilites virais se baseia apenas no uso de analgésicos e anti-inflamatórios. Aparentemente não há vantagem no uso de corticosteroides, sendo recomendado apenas o uso de anti-inflamatórios não esteroidais como o ibuprofeno^{12; 57}.

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo é identificar os microorganismos responsáveis pela etiologia das faringotonsilites agudas em pacientes adultos do município de São Carlos.

3. Casuística e Métodos

3.1 População

Foram convidados a participar do estudo adultos na faixa etária de 18 a 45 anos, provenientes do município de São Carlos e região, com quadro clínico compatível com faringotonsilite aguda que consintam em participar da pesquisa. Os pacientes triados pela equipe do Serviço de Urgência Médica (SMU) da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos que apresentavam como queixa principal “dor de garganta” foram direcionados para o atendimento pela equipe do protocolo de pesquisa.

O estudante autor do presente TCC acompanhou e participou de atendimentos realizados pela pesquisadora responsável (Dr.^a Sigrid De Sousa dos Santos) (Figura 1). ou de médico contratado pela equipe de pesquisa para sua substituição (Dr. Hendrick Henrique Fernandes Gramasco), em escala alternada com colega responsável pela avaliação clínica dos pacientes participantes do projeto (Daniel Basile Velloso de Oliveira).

Figura 1. Pesquisadores durante atendimento do protocolo



3.2 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos através da Plataforma Brasil (CAAE: 83082018.4.0000.8148). Todos os pacientes que decidiram participar da pesquisa concordaram assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após esclarecer eventuais dúvidas. . O financiamento foi feito integralmente pelo Instituto de Física de São Carlos, através de projeto aprovado na FAPESP: CEPOF Grant n° 13/07276-1.

3.3 Critérios de Inclusão

- Idade entre 18a e 45a
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Presença de febre $>38^{\circ}\text{C}$, hiperemia de orofaringe, hipertrofia ou presença de exsudato em tonsilas palatinas.

3.4 Critérios de Exclusão

- Uso de antibiótico nas 24 horas prévias à admissão no protocolo.
- Condição clínica que indicasse o uso imediato de antibioticoterapia (sepse, abscesso periamigdaliano, insuficiência orgânica, imunodeficiência, suspeita clínica de síndrome de Lemierre).

3.5 Avaliação de entrada

Todos os pacientes com suspeita clínica de faringotonsilite foram examinados e investigados quanto à presença de febre, hipertrofia de tonsilas, exsudatos tonsilares, adenomegalia cervical anterior, lesões em mucosas (petéquias, vesículas, exulcerações), tosse, obstrução nasal, lacrimejamento e diarreia.

3.6 Coleta do Material

O protocolo de coleta de exames está descrito na Figura 2. Uma vez sendo admitidos no estudo, era colhido um esfregaço de orofaringe para realização de teste rápido para EBHGA (Figura 3) e para coloração de Gram. Outro esfregaço era colocado em meio de transporte (Stuart) para posterior cultura, sendo semeado em ágar sangue, chocolate e Mac Conkey (Figura 4) no laboratório de microbiologia da

Unimed São Carlos, sob a responsabilidade da biomédica Natalia Sardella. Um terceiro esfregaço era imediatamente colocado em microtubo autoclavado (2,0 mL) contendo 1,5 mL de solução salina tamponada com fosfato (Phosphate-Buffered Saline - PBS) e armazenado a -20°C até a realização de reação em cadeia por polimerase (PCR) para *Fusobacterium necrophorum*.⁵⁹ Finalmente um quarto swab era acondicionado em PBS com RNA later, congelado e mantido -20°C para posterior realização de painel de detecção de vírus respiratórios por reação em cadeia por polimerase (vírus influenza A e B, adenovírus, rinovírus, coronavírus OC43, vírus Epstein-Barr e herpes simplex vírus). Com a pandemia de coronavírus-19, incluiu-se na pesquisa o RT-PCR para SARS-CoV-2.

Figura 2. Algoritmo de inclusão de pacientes e realização de exames para diagnóstico etiológico da faringotonsilite.

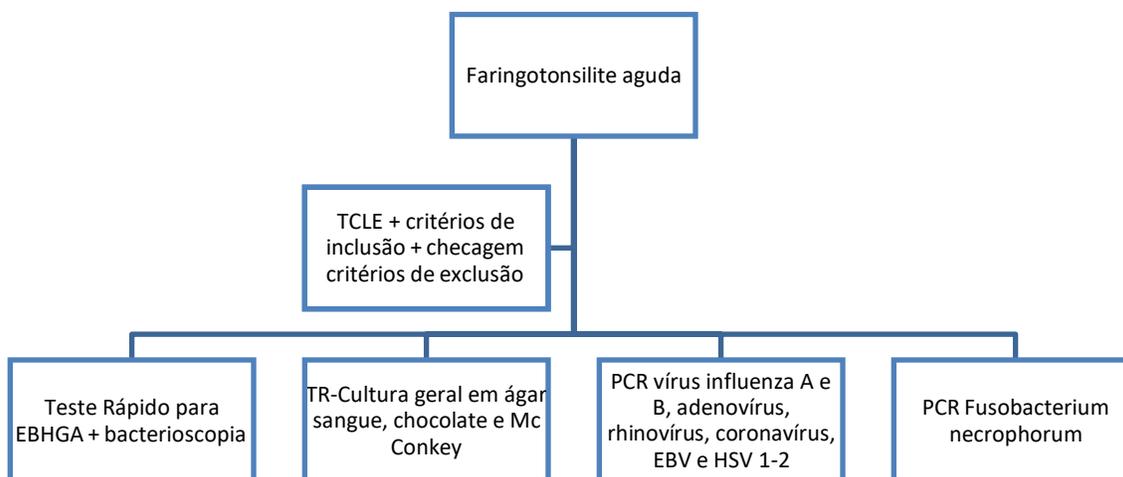


Figura 3. Teste rapido imunocromatográfico para EBHGA



Figura 4. Ágar sangue com cultura positiva para EBHGA



Em caso de indicação clínica, era solicitada sorologia para EBV (suspeita de mononucleose infecciosa), para HSV (suspeita de primoinfecção herpética). Em caso de evolução com complicação clínica, eventualmente solicitado PCR para bactérias com

3.7. PCR para *Fusobacterium necrophorum* e EBHGA

As identificações de bactérias por biologia molecular foram realizadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa Molecular Dr Ivo Ricci, São Carlos, SP sob a supervisão de Giannina Ricci, Angela Satie Nishikaku e Regina Affonso.

3.7.1 Extração de DNA

Foram realizadas com o kit QIAamp™ DNA mini (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Os DNAs purificados foram armazenados a -20° C.

3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para identificação molecular e detecção de *Fusobacterium necrophorum* foram realizados ensaios com os seguintes genes:

- PCR de fragmento do gene que codifica a DNA girase, subunidade B (*gyrB*) para identificação de *Fusobacterium necrophorum*
- Como controle de extração de DNA de bactérias, realizou-se PCR a partir de duas regiões hipervariáveis do gene 16S do RNA ribossômico, V3 e V6 (V3 e V6-16S-rRNA).
- Foi realizada também PCR com gene da β -globina humana como controle de extração de DNA, quando houve ausência dos genes acima (itens i e ii) confirmando a presença e integridade do DNA nas amostras clínicas de *swab*.

As amostras de DNA purificadas (0,5 μ g) foram utilizadas como *template* para amplificação e cada uma delas foi preparada em 12,5 μ L de PCR Master Mix, 2X (components: 50 units/ml de Taq DNA polimerase em tampão de reação adequado (pH 8,5), 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP, 3 mM MgCl₂) (Promega Corporation 2800 Woods Hollow Road Madison, WI, EUA) e 2 μ M de cada *primer* (senso e antissenso). As condições de temperatura e tempo descritas para cada alvo molecular, conforme a Tabela 1 e os resultados podem ser observados na Tabela 2, abaixo.

Como em dois de doze pacientes com Teste Rápido positivo para EBGHA, o agente não cresceu em cultura, realizou-se também PCR para EBHGA dessas amostras. A identificação específica do *Streptococcus pyogenes* foi realizada a partir do gene que codifica a protease exotoxina pirogênica estreptócica B (*speB*). Uma amostra (numero 21) teve que ser excluída por problemas técnicos na estocagem.

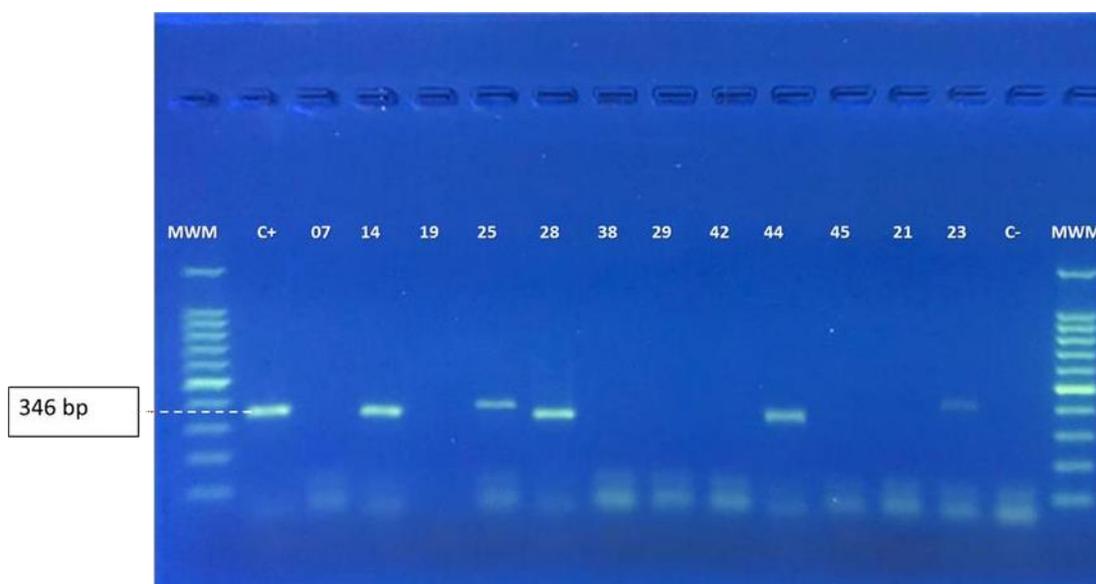
As 11 amostras de DNA purificadas (0,5 μ g) foram utilizadas como *template* para amplificação e cada uma delas foi preparada em 12,5 μ L de PCR Master Mix, 2X (components: 50 units/ml de Taq DNA polimerase em tampão de reação adequado (pH 8,5), 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP, 3 mM MgCl₂) (Promega Corporation 2800 Woods Hollow Road Madison, WI, EUA) e 2 μ M de cada *primer* (senso e antissenso). Todas as PCRs foram realizadas em termociclador GeneAmp 2720, Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific nas condições de temperatura e tempo descritas para cada alvo molecular, conforme a Tabela 2. Após o término da reação, as amostras foram mantidas a 4 °C até a

retirada do termociclador. Para cada set de reações de amplificação do DNA, utilizamos como controles positivos, amostras contendo o DNA alvo de interesse e como controles negativos, amostras de DNA extraídas de cultura pura de *Candida albicans* e derivadas de amostras humanas (sem bactérias) foram utilizadas em todas as reações de amplificação do DNA.

3.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com o emprego de corante fluorescente SYBR™ safe (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA) e visualizados em transiluminador UV (Kasvi, modelo K33-312A) (Figura 5).

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados de DNA por PCR do gene SpeB do EBHGA (Primers SpeB-F and SpeB-R)



3.7.4 Reação de sequenciamento de DNA

O sequenciamento do DNA pelo método de Sanger foi realizado para padronização da PCR e confirmação da especificidade desse ensaio para a identificação molecular específica de *Fusobacterium necrophorum* em duas amostras que resultaram positivas na PCR de *gyrB*. As amostras positivas na PCR para EBHGA foram avaliadas no sequenciamento para confirmação da identificação

de *S. pyogenes*.

Os amplicons ou produtos das PCRs foram submetidos à reação de sequenciamento de ambas as fitas, *forward* (senso) e *reverse* (antissenso). As amostras e os *primers* foram enviados ao serviço de sequenciamento de Sanger realizado pelo Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, do Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo ou realizado pela empresa de biotecnologia Macrogen, Inc. (Coreia do Sul).

A qualidade dos resultados do sequenciamento de DNA gerados como cromatogramas ou eletroferogramas (arquivos com extensão .ab1) foi analisada pelo programa *Finch TV*, versão 1.4.0 (www.geospiza.com/finchtv), considerando aceitável um escore de *Phred* ≥ 20 .

Para a montagem e edição dos contigs, utilizamos o programa Sequencher® 4.1.4 (Gene Codes Co., USA). As sequências consenso foram alinhadas e comparadas a sequências referência disponíveis no banco de dados públicos de sequências nucleotídicas, por meio da ferramenta de alinhamento local *Nucleotide BLAST* (BLASTn, *Basic Local Alignment Search Tool*, GenBank - NCBI, EUA; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).^{60; 61} A porcentagem de identidade ou similaridade das sequências no BLASTn maior ou igual a 98% e *e-value* (*expect value*) $<10^{-5}$ foram considerados resultados confiáveis para a identificação em nível de espécie.

Tabela 2. Descrição dos alvos moleculares utilizados para amplificação do DNA de bactérias e de DNA humano em amostras de swab de pacientes com faringotonsilite e condições da PCR

Identificação	Gene	Primers	Condições	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>gyrB</i>	Senso: 5'-AGGATTGCATGGAGTAGGAA-3' Antissenso: 5'-CCTATTTCAATTCGA CAATCCA-3'	Desnaturação inicial: 95° C por 10 minutos 40 ciclos: desnaturação a 95° C por 30 segundos, hibridização a 60° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 30 segundos	306 pb	Jensen et al. (2007) ⁶²
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>speB</i>	Senso: 5'-GGTTCTGCAGGTAGCTCTCG-3' Antissenso: 5'-TGCCTACAACAGCACTTTGG-3'	Desnaturação inicial: 95° C por 5 minutos 35 ciclos: desnaturação a 95° C por 30 segundos, hibridização a 59° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos Extensão final: 72° C por 7 minutos	346 pb	Dunne et al. (2013) ⁶³
Todas as bactérias	V6-16S-rRNA	Senso: 5'-TCGAtGCAACGCGAAGAA-3' Antissenso: 5'-ACATtTCACaACACGAGCTGACGA-3'	Desnaturação inicial: 95° C por 10 minutos 45 ciclos: desnaturação a 95° C por 20 segundos, hibridização a 52° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos Extensão final: 72° C por 5 minutos	125 pb	Chakravorty et al. (2007) ⁶⁴
	V3-16S rRNA	Senso: 5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3' Antissenso: 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTG-3'	Desnaturação inicial: 95° C por 10 minutos 45 ciclos: desnaturação a 95° C por 20 segundos, hibridização a 52° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos Extensão final: 72° C por 5 minutos	204 pb	Chakravorty et al. (2007) ⁶⁴
DNA humano (controle de extração de DNA nas amostras)	β -globina humana (BGH)	Senso: 5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3' Antissenso: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	Desnaturação inicial: 94° C por 5 minutos 35 ciclos: desnaturação a 94° C por 1 minuto, hibridização a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos Extensão final: 72° C por 10 minutos	268 pb	Gattás & Soares-Vieira (2000) ⁶⁵

3.8. PCR para vírus

As análises genômicas virais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada da Universidade de São Carlos UFSCar (Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha e M.^e João Pedro Mais de Oliveira da Silva). Os testes para SARS-COV-2 foram realizados utilizando o sistema StepOne Plus™ (Thermo Fisher Scientific) em placa de 96 poços selada com fita adesiva óptica MicroAmp (Thermo Fisher Scientific). O volume total da reação foi de 12 µl, contendo 6 µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 3 µl de primer forward e reverse na concentração apropriada e 3 µl de cDNA. Cada cDNA da replicata biológica (três cDNAs para cada réplica biológica) foi analisado em triplicata técnica. As condições de temperatura foram 10 min a 95 °C (ativação da polimerase) seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C durante 1 min (anelamento/extensão). As análises estão em fase de finalização.

4. Resultados Preliminares

De 20 e maio de 2019 a 29/01/2020 foram inclusos no estudo 47 pacientes com faringotonsilite aguda, sendo 53,2% do sexo masculino, com idade média de 23,6 anos (19-43 anos).

Até o momento obtivemos os resultados de coloração Gram e cultura geral, de PCR para *Fusobacterium necrophorum*, de PCR para adenovírus, Epstein-Barr, herpes simplex vírus e de exames sorológicos eventualmente solicitados por indicação clínica. Aguardamos PCR para os vírus influenza A e B, rinovírus e coronavírus OC43.

A etiologia foi bacteriana em 20 pacientes (42,6%), viral em sete pacientes (14,9%), e mista – bacteriana e viral em 5 pacientes (10,6%). A Tabela 3 lista os agentes etiológicos isolados ou detectados e respectiva frequência na amostra.

Tabela 3. Agentes etiológicos de faringotonsilites agudas, São Carlos, 2019-2020

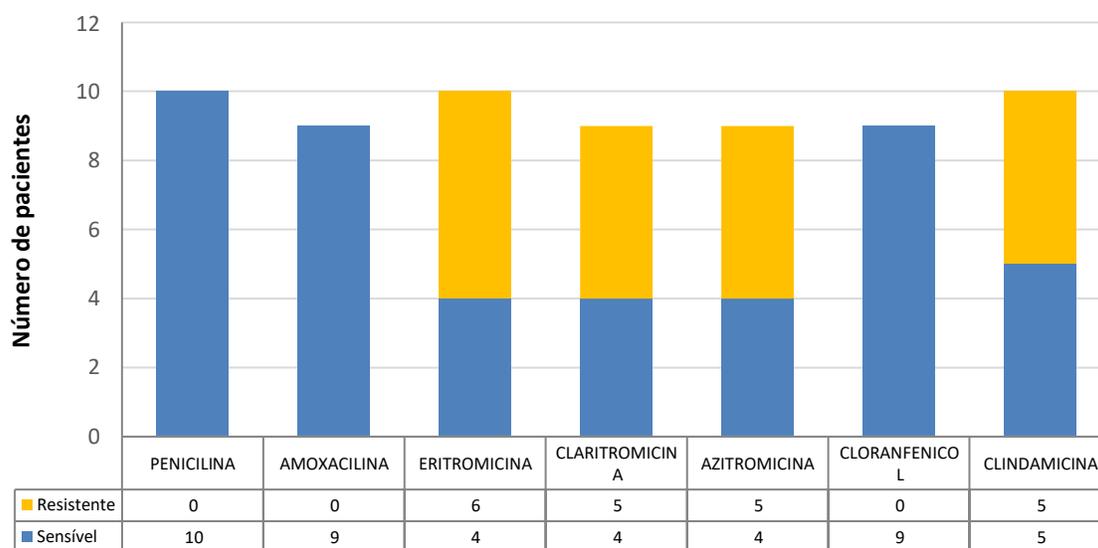
Etiologia	Número de pacientes	Frequência (%)
Bacterias		
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico Grupo A	12	25,5
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico Grupo B	2	4,3
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico Grupo C	1	2,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	4,3
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	2,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2,1
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	5	10,6
<i>Prevotella sp</i>	1	2,1
Vírus		
HSV	8	17,0
Vírus Epstein-Barr (EBV)	2	4,3
Adenovirus	1	2,1
Coronavirus-19	0	0
Outros*	*	*

Observação: Aguardamos PCR para vírus influenza A e B, rinovírus e coronavírus OC43.

Em relação á sensibilidade aos antimicrobiana, todos os isolados de

Streptococcus beta-hemolítico Grupo A eram sensíveis á penicilina, entre 55 e 60% eram resistentes aos macrolídeos e 50% eram resistentes à clindamicina (Figura 6)

Figura 6. Padrão de resistência antimicrobiana de *Streptococcus* beta-hemolíticos do grupo A isolados de pacientes com faringotonsilites agudas, São Carlos, 2019-2020



4. Discussão

A importância do EBHGA como causa de faringotonsilites reside em sua alta incidência e na possibilidade de complicações locais e sistêmicas é considerada a etiologia bacteriana mais comum das faringotonsilites,^{9; 35} sendo responsável por cerca de 5 a 30% dos casos de faringotonsilite.^{21; 66} Em adultos espera-se menos incidência do agente. No entanto, no presente estudo realizado em população adulta 25,5% das faringotonsilites agudas ainda foram causadas por EBHGA.

Além das complicações supurativas locais o EBHGA pode causar complicações sistêmicas que incluem a febre reumática e a glomerulonefrite pós-estreptocócica.^{9; 66; 67}

Quanto à sensibilidade das doze cepas isoladas de EBHGA, todas eram sensíveis à penicilina, o que mantém o uso de penicilina, amoxicilina e ampicilina como primeira escolha para o tratamento do agente. No entanto, apenas entre 40 e 45% dos EBHGA apresentaram sensibilidade a macrolídeos. Em caso de alergia à penicilina a alta taxa de resistência é impeditiva para seu uso rotineiro.⁶⁸ Merece menção o fato de que a faringotonsilite aguda tem sido amplamente tratada com esta classe de antibióticos em nosso meio, e a falha terapêutica pode desencadear complicações como a febre reumática e a glomerulonefrite difusa aguda.^{4; 69}

Há divergências sobre o papel do Fn como patógeno primário de faringotonsilites agudas. Alguns trabalhos encontraram por volta de 10% de PCR positivo para Fn em pacientes com faringotonsilites e não detectaram material genético do agente em nenhum controle saudável.⁸ Quando foi realizado isolamento por cultura, o agente foi isolado em 15% dos pacientes sintomáticos e em 3% dos pacientes assintomáticos.⁹ No entanto, o encontro do agente em amostras biológicas sem sintomatologia associada mantém dúvida em relação ao seu grau de patogenicidade.^{8; 70}

No presente estudo, Fn foi responsável pela faringotonsilite em cinco pacientes (10,6%). Há relato de maior prevalência do microrganismo nos pacientes mais jovens, mas nossa casística não permite essa análise.^{9; 62; 70; 71} Aparentemente há associação entre a presença de Fn nas tonsilas e infecção concomitante por

outros microrganismos.^{9; 71} No presente estudo, em dois dos cinco pacientes com detecção do Fn havia coinfeção, sendo um por EBV e *Streptococcus spp* e outro por HSV. As infecções por Fn estão associadas a possibilidade de complicações supurativas graves.⁷² Embora não seja o propósito da presente dissertação discorrer sobre as manifestações clínicas dos pacientes, uma vez que se trata tema de pesquisa de outro componente do grupo de pesquisa, uma paciente com faringotonsilite por Fn, EBV e *Streptococcus sp* evoluiu com abscesso peritonsilar, sepse e necessidade de internação para antibioticoterapia e expansão com cristalóides.

Como o projeto foi surpreendido pela pandemia de COVID-19 durante sua execução, sendo que o ensaio clínico “TRATAMENTO DE FARINGOTONSILITES COM AÇÃO FOTODINÂMICA” precocemente finalizado antes de completar a amostra estipulada de 126 pacientes. No entanto, pôde avaliar a distribuição dos agentes etiológicos de faringotonsilites agudas em nosso meio, antes do advento da pandemia. Não foi detectado SARS-CoV-2 nas amostras do projeto, mas essa realidade provavelmente sofreu modificação com a pandemia.

5. Conclusões

As faringotonsilites agudas em pacientes adultos do município de São Carlos foram causadas por bactérias em 42,6% dos pacientes, por vírus em 14,9%, e por bactérias e vírus em 10,6%. Não foi possível isolar o agente em 31,9% dos casos.

O principal agente bacteriano foi o *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A, sensível à penicilina, com alta resistência tanto a macrolídeos (55-60%), quanto à clindamicina (50%). O segundo agente bacteriano foi o anaeróbio *Fusobacterium necrophorum*, geralmente não investigado laboratorialmente nem tratado de forma rotineira, e com potencial de complicação supurativa grave.

Em relação às etiologias virais, em resultado preliminar o HSV foi responsável por 17% das faringotonsilites agudas, e o Vírus Epstein-Barr por 4,3%.

6. ANEXO I. AUTOAVALIAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Aprender a aprender é uma das metas do curso de Medicina da UFSCar. Desde o início do curso passando pelas matérias básicas até os períodos do internato focados na prática, tentei ao máximo desenvolver as competências relacionadas à profissão, mas também refletir sobre a veracidade e evidência das informações às quais tenho acesso. Considero essa oportunidade de extrema importância no contexto atual.

Dito isso, a Iniciação Científica trouxe várias dificuldades: buscar informações relacionadas à terapêutica, diagnóstico e clínica dos pacientes a serem inclusos; informar e tirar dúvidas sobre o TCLE; basear o Ensaio na ética e nos princípios da Pesquisa Clínica.

Além disso, a Iniciação Científica complementou o ensino da Graduação e fez parte de mais de um terço do tempo que estive na UFSCar.

Durante os anos de internato, me detive a participar menos de atividades extracurriculares e foquei as atenções às provas de Residência Médica e à prática na Graduação. Depois de muito aprender a aprender nesse curso que sempre traz reflexão na formação do médico, estou continuamente me lembrando desses anos tão importantes agora na Residência de Clínica Médica na UNESP.

Cada momento representou muito na minha formação, especialmente a pesquisa, os professores, os pacientes e os amigos

PEDRO GIMENES GRANDIN FILHO

Estudante do Curso de Medicina

Universidade Federal de São Carlos

7. ANEXO II. AVALIAÇÃO DO ORIENTADOR PEDAGÓGICO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

AVALIAÇÃO

A trajetória do estudante PEDRO GIMENES GRANDIN FILHO foi seguida ao longo dos seis anos, avaliada por mim foi aprovada em 20 de janeiro de 2023. O Trabalho de Conclusão de Curso, produzido pelo estudante como iniciação científica sob orientação das professoras Kate Cristina Blanco e Sigrid De Sousa dos Santos foi corrigido pelas orientadoras científicas, avaliado e aprovado por mim para substituição no repositório institucional.

Prof. Dr. Cláudio Ricardo de Oliveira
Orientador pedagógico
Universidade Federal de São Carlos

SÃO CARLOS – SP, DATA 10/04/2023

8. Referências Bibliográficas

- 1 VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**, v. 40, n. 4, p. 277-83, Apr 2015. ISSN 1052-1372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123> >.
- 2 ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes New Infect**, v. 6, p. 22-9, Jul 2015. ISSN 2052-2975. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26029375> >.
- 3 GALIOTO, N. J. American Academy of Family Physicians. Information from your family doctor. Peritonsillar abscess: what you should know. **Am Fam Physician**, v. 77, n. 2, p. 209, Jan 15 2008. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18246891> >.
- 4 KUMAR, R. K.; TANDON, R. Rheumatic fever & rheumatic heart disease: the last 50 years. **Indian J Med Res**, v. 137, n. 4, p. 643-58, Apr 2013. ISSN 0975-9174. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23703332> >.
- 5 ALHAMOUD, M. A. et al. A Comprehensive Review Study on Glomerulonephritis Associated With Post-streptococcal Infection. **Cureus**, v. 13, n. 12, p. e20212, Dec 2021. ISSN 2168-8184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35004032> >.
- 6 CENTOR, R. M. et al. The clinical presentation of Fusobacterium-positive and streptococcal-positive pharyngitis in a university health clinic: a cross-sectional study. **Ann Intern Med**, v. 162, n. 4, p. 241-7, Feb 2015. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686164> >.
- 7 ATKINSON, T. P. et al. Analysis of the tonsillar microbiome in young adults with sore throat reveals a high relative abundance of Fusobacterium necrophorum with low diversity. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0189423, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351278> >.
- 8 ALIYU, S. H. et al. Real-time PCR investigation into the importance of Fusobacterium necrophorum as a cause of acute pharyngitis in general practice. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 10, p. 1029-35, Oct 2004. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358827> >.
- 9 HEDIN, K. et al. The aetiology of pharyngotonsillitis in adolescents and adults - Fusobacterium necrophorum is commonly found. **Clin Microbiol**

- Infect**, v. 21, n. 3, p. 263.e1-7, Mar 2015. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658556> >.
- 10 PELUCCHI, C. et al. Guideline for the management of acute sore throat. **Clin Microbiol Infect**, v. 18 Suppl 1, p. 1-28, Apr 2012. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432746> >.
- 11 MORRIS, S. R. et al. Prevalence and incidence of pharyngeal gonorrhoea in a longitudinal sample of men who have sex with men: the EXPLORE study. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 10, p. 1284-9, Nov 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051493> >.
- 12 SHULMAN, S. T. et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 10, p. 1279-82, Nov 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23091044> >.
- 13 LIN, M. H. et al. Predictive value of clinical features in differentiating group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis in children. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 36, n. 1, p. 21-5, Mar 2003. ISSN 1684-1182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12741728> >.
- 14 SHAIKH, N.; LEONARD, E.; MARTIN, J. M. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 126, n. 3, p. e557-64, Sep 2010. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696723> >.
- 15 VICEDOMINI, D. et al. [Diagnosis and management of acute pharyngotonsillitis in the primary care pediatrician's office]. **Minerva Pediatr**, v. 66, n. 1, p. 69-76, Feb 2014. ISSN 0026-4946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24608583> >.
- 16 BA-SADDIK, I. A. et al. Prevalence of Group A beta-haemolytic Streptococcus isolated from children with acute pharyngotonsillitis in Aden, Yemen. **Trop Med Int Health**, v. 19, n. 4, p. 431-9, Apr 2014. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24405659> >.
- 17 KRONMAN, M. P.; ZHOU, C.; MANGIONE-SMITH, R. Bacterial prevalence and antimicrobial prescribing trends for acute respiratory tract infections. **Pediatrics**, v. 134, n. 4, p. e956-65, Oct 2014. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225144> >.
- 18 EBELL, M. H. et al. The rational clinical examination. Does this patient have strep throat? **JAMA**, v. 284, n. 22, p. 2912-8, Dec 2000. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147989> >.

- 19 WALD, E. R. et al. A streptococcal score card revisited. **Pediatr Emerg Care**, v. 14, n. 2, p. 109-11, Apr 1998. ISSN 0749-5161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9583390> >.
- 20 ATTIA, M. et al. Multivariate predictive models for group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis in children. **Acad Emerg Med**, v. 6, n. 1, p. 8-13, Jan 1999. ISSN 1069-6563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9928970> >.
- 21 ANJOS, L. M. et al. Streptococcal acute pharyngitis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 4, p. 409-13, Jul 2014. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25229278> >.
- 22 DANCHIN, M. H. et al. Burden of acute sore throat and group A streptococcal pharyngitis in school-aged children and their families in Australia. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. 950-7, Nov 2007. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974731> >.
- 23 DUBLIN, T. D. et al. Milk-borne Outbreaks Due to Serologically Typed Hemolytic Streptococci. **Am J Public Health Nations Health**, v. 33, n. 2, p. 157-66, Feb 1943. ISSN 0002-9572. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18015742> >.
- 24 PICHICHERO, M. E. Group A streptococcal tonsillopharyngitis: cost-effective diagnosis and treatment. **Ann Emerg Med**, v. 25, n. 3, p. 390-403, Mar 1995. ISSN 0196-0644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7864482> >.
- 25 TSEVAT, J.; KOTAGAL, U. R. Management of sore throats in children: a cost-effectiveness analysis. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 153, n. 7, p. 681-8, Jul 1999. ISSN 1072-4710. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401800> >.
- 26 CARAPETIS, J. R. et al. The global burden of group A streptococcal diseases. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 11, p. 685-94, Nov 2005. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253886> >.
- 27 AAP. American Academy of Pediatrics. Group A streptococcal infections. In: KIMBERLIN, D. W.;BRADY, M. T., *et al* (Ed.). **Red Book**. Elk Grove Village, IL: AAP, 2015. cap. Section 3: Summaries of Infectious Disease, p.732-744.
- 28 SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. Streptococcus. In: VERSALOVIC, J.;CARROLL, K. C., *et al* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 10 th. Washington, DC: ASM Press, v.20, 2011. p.331-349.
- 29 _____. Laboratory Diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). In: FERRETTI, J. J.;STEVENS, D. L., *et al* (Ed.).

Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations.
Oklahoma City, (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, v.1,
2016. p.12.

- 30 MCCARTY, M. Present state of knowledge concerning pathogenesis and treatment of rheumatic fever. **Bull N Y Acad Med**, v. 28, n. 5, p. 307-34, May 1952. ISSN 0028-7091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14916303> >.
- 31 HYNES, W. Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. **Front Biosci**, v. 9, p. 3399-433, Sep 2004. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353367> >.
- 32 GINSBURG, I. Mechanisms of cell and tissue injury induced by group A streptococci: relation to poststreptococcal sequelae. **J Infect Dis**, v. 126, n. 4, p. 419-56, Oct 1972. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4563791> >.
- 33 YANG, L. P. et al. Variations in the protective immune response against streptococcal superantigens in populations of different ethnicity. **Med Microbiol Immunol**, v. 195, n. 1, p. 37-43, Mar 2006. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988608> >.
- 34 GERBER, M. A. et al. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute Streptococcal pharyngitis: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. **Circulation**, v. 119, n. 11, p. 1541-51, Mar 2009. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246689> >.
- 35 BISNO, A. L. Acute pharyngitis. **N Engl J Med**, v. 344, n. 3, p. 205-11, Jan 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172144> >.
- 36 GUNNARSSON, R. K.; HOLM, S. E.; SÖDERSTRÖM, M. The prevalence of beta-haemolytic streptococci in throat specimens from healthy children and adults. Implications for the clinical value of throat cultures. **Scand J Prim Health Care**, v. 15, n. 3, p. 149-55, Sep 1997. ISSN 0281-3432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323783> >.
- 37 UHL, J. R. et al. Comparison of LightCycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A streptococci from throat swabs. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 242-9, Jan 2003. ISSN 0095-1137.

- Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517855> >.
- 38 MCISAAC, W. J. et al. Empirical validation of guidelines for the management of pharyngitis in children and adults. **JAMA**, v. 291, n. 13, p. 1587-95, Apr 2004. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069046> >.
- 39 DINGLE, T. C.; ABBOTT, A. N.; FANG, F. C. Reflexive culture in adolescents and adults with group A streptococcal pharyngitis. **Clin Infect Dis**, v. 59, n. 5, p. 643-50, Sep 2014. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867784> >.
- 40 CHAPIN, K. C.; BLAKE, P.; WILSON, C. D. Performance characteristics and utilization of rapid antigen test, DNA probe, and culture for detection of group a streptococci in an acute care clinic. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4207-10, Nov 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409399> >.
- 41 BISNO, A. L. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 2, p. 113-25, Jul 2002. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12087516> >.
- 42 BRANDT, C. M. et al. Characterization of blood culture isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p. 4194-7, Dec 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10565964> >.
- 43 LANCEFIELD, R. C. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. **J Exp Med**, v. 57, n. 4, p. 571-95, Mar 1933. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870148> >.
- 44 MALHOTRA-KUMAR, S. et al. Bacitracin-resistant clone of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Belgium. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5282-4, Nov 2003. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605184> >.
- 45 HAMOUDI, A. C.; MARCON, M. J.; CANNON, H. J. Evaluation of rapid identification of gram-positive cocci in positive blood cultures by use of the AutoMicrobic system Gram-Positive Identification Card. **J Clin Microbiol**, v. 20, n. 2, p. 171-4, Aug 1984. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6436292> >.
- 46 SCHULTHESS, B. et al. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry:

- comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 1834-40, Jun 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554198> >.
- 47 ALTUN, O. et al. Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 12, p. 4130-6, Dec 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088863> >.
- 48 WOJEWODA, C. M. et al. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 7, p. 2072-6, Jul 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596240> >.
- 49 STEED, L. L.; KORGESKI, E. K.; DALY, J. A. Rapid detection of *Streptococcus pyogenes* in pediatric patient specimens by DNA probe. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 11, p. 2996-3000, Nov 1993. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8263185> >.
- 50 POKORSKI, S. J. et al. Comparison of Gen-Probe Group A streptococcus Direct Test with culture for diagnosing streptococcal pharyngitis. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 6, p. 1440-3, Jun 1994. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077386> >.
- 51 NAKHOUL, G. N.; HICKNER, J. Management of adults with acute streptococcal pharyngitis: minimal value for backup strep testing and overuse of antibiotics. **J Gen Intern Med**, v. 28, n. 6, p. 830-4, Jun 2013. ISSN 1525-1497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23054930> >.
- 52 ANDERSON, N. W. et al. Multicenter clinical evaluation of the illumigene group A *Streptococcus* DNA amplification assay for detection of group A *Streptococcus* from pharyngeal swabs. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 1474-7, May 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447639> >.
- 53 NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; MARQUES, H. H. The Brazilian Society of Pediatrics, Department of Infectious Diseases guidelines for the management of children and adolescents with acute pharyngitis. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 1, p. 79-80; author reply 80-2, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0021-7557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16532155> >.
- 54 CHIAPPINI, E. et al. Analysis of different recommendations from international guidelines for the management of acute pharyngitis in adults

- and children. **Clin Ther**, v. 33, n. 1, p. 48-58, Jan 2011. ISSN 1879-114X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397773> >.
- 55 DESJARDINS, M. et al. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in group A and group B Streptococcus: implications for reporting susceptibility results. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5620-3, Dec 2004. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583291> >.
- 56 SPINKS, A.; GLASZIOU, P. P.; DEL MAR, C. B. Antibiotics for sore throat. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 11, p. CD000023, 2013. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24190439> >.
- 57 LOPARDO, G. et al. [Consensus guidelines for the management of upper respiratory tract infections]. **Medicina (B Aires)**, v. 72, n. 6, p. 484-94, 2012. ISSN 0025-7680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241293> >.
- 58 LUZURIAGA, K.; SULLIVAN, J. L. Infectious mononucleosis. **N Engl J Med**, v. 362, n. 21, p. 1993-2000, May 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505178> >.
- 59 BANK, S. et al. Fusobacterium necrophorum- detection and identification on a selective agar. **APMIS**, v. 118, n. 12, p. 994-9, Dec 2010. ISSN 1600-0463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21091782> >.
- 60 ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J Comput Biol**, v. 7, n. 1-2, p. 203-14, 2000. ISSN 1066-5277. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10890397> >.
- 61 MORGULIS, A. et al. Database indexing for production MegaBLAST searches. **Bioinformatics**, v. 24, n. 16, p. 1757-64, Aug 15 2008. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18567917> >.
- 62 JENSEN, A.; HAGELSKJAER KRISTENSEN, L.; PRAG, J. Detection of Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme in tonsillitis in young adults by real-time PCR. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, n. 7, p. 695-701, Jul 2007. ISSN 1198-743X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17403128> >.
- 63 DUNNE, E. M. et al. Detection of group a streptococcal pharyngitis by quantitative PCR. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 312, Jul 11 2013. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844865> >.
- 64 CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v.

- 69, n. 2, p. 330-9, May 2007. ISSN 0167-7012. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391789> >.
- 65 GATTÁS, G. J.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup Med (Lond)**, v. 50, n. 7, p. 508-11, Sep 2000. ISSN 0962-7480. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11198676> >.
- 66 STJERNQUIST-DESATNIK, A.; ORRLING, A. Pharyngotonsillitis. **Periodontol 2000**, v. 49, n. 1, p. 140-50, Feb 2009. ISSN 1600-0757. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152531> >.
- 67 MUTHANNA, A. et al. Clinical Screening Tools to Diagnose Group A Streptococcal Pharyngotonsillitis in Primary Care Clinics to Improve Prescribing Habits. **Malays J Med Sci**, v. 25, n. 6, p. 6-21, Nov 2018. ISSN 1394-195X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30914875> >.
- 68 SILVA-COSTA, C. et al. Macrolide-resistant Streptococcus pyogenes: prevalence and treatment strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 13, n. 5, p. 615-28, May 2015. ISSN 1744-8336. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25746210> >.
- 69 WESSELS, M. R. **Pharyngitis and Scarlet Fever**. Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations. FERRETTI, J. J.; STEVENS, D. L., et al. Oklahoma City: University of Oklahoma Health Sciences Center: 15 p. 2016.
- 70 AMESS, J. A. et al. A six-month audit of the isolation of Fusobacterium necrophorum from patients with sore throat in a district general hospital. **Br J Biomed Sci**, v. 64, n. 2, p. 63-5, 2007. ISSN 0967-4845. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17633139> >.
- 71 LUDLAM, H. et al. Epidemiology of pharyngeal carriage of Fusobacterium necrophorum. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 9, p. 1264-1265, Sep 2009. ISSN 0022-2615. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528186> >.
- 72 RIORDAN, T. Human infection with Fusobacterium necrophorum (Necrobacillosis), with a focus on Lemierre's syndrome. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 4, p. 622-59, Oct 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934077> >.