UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Codeteccção de bactérias em pacientes com adenoamigdalite crônica

Mirela Cristina Moreira Prates

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Codeteccção de bactérias em pacientes com Adenoamigdalite Crônica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aluna: Mirela Cristina Moreira Prates

Orientador: Prof. Dr. Edwin Tamashiro

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Prates, Mirela Cristina Moreira.

Codeteccção de bactérias em pacientes com Adenoamigdalite Crônica. Ribeirão Preto, 2015.

55p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Tamashiro, Edwin.

1. Hipertrofia. 2. Bactérias. 3. Codeteccções. 4. Prevalência.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mirela Cristina Moreira Prates

Codeteccção de bactérias em pacientes com Adenoamigdalite Crônica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia,
Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e
Pescoço para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

Orientador: Prof. Dr. Edwin Tamashiro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimento

Gostaria de agradecer especialmente a Prof. Dra. Wilma Teresinha Anselmo Lima e Prof. Dr. Edwin Tamashiro, admiráveis e competentes profissionais por me orientar durante o mestrado e dividir seus ensinamentos nesse tempo de convivência. É uma honra poder fazer parte da sua equipe e desfrutar do seu conhecimento e entusiasmo pela pesquisa científica.

Ao Dr. Eurico Arruda que me coorientou e me ensinou com toda sua experiência.

Aos membros da banca, muito obrigada por disponibilizarem seu precioso tempo na leitura e participação da minha dissertação de mestrado.

Gostaria de agradecer a Pós-Doutoranda Miriã Criado que muito me ajudou nas análises de todo o trabalho, a Bruna que durante todo o tempo estava ao meu lado auxiliando no que era preciso e ao Anibal que também muito contribuiu para realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer em especial às pessoas que diretamente estiveram relacionadas com este trabalho: Tamara, Miriã, José Luiz, Flávia, Bruna, Dr. Guilherme, Dr. Lucas, Dr. Edwin, Dra. Fabiana, Dra Wilma, Dr. Eurico.

Muito obrigada a todos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Patogênese Viral que me ensinaram, ajudaram e participaram direta ou indiretamente neste trabalho (Maria Lúcia Silva, Rodrigo, Gustavo, Talita, Marcus Vinícius, Nathalie, Ronaldo, Ricardo, Luciano e Marcos Michel).

Muito obrigada a toda a equipe de otorrinolaringologia que fizeram as coletas dos tecidos de amígdalas e adenoides (Dra. Fabiana Valera, Dr. Edwin Tamashiro, Dr. Guilherme Buzzato).

Quero agradecer e dedicar este trabalho a minha mãe Marli, a minha irmã Mônica, meu cunhado Marcelo e minha sobrinha Júlia, pelo incentivo e por sempre estarem ao meu lado me dando todo apoio nos momentos difíceis. Vocês foram essenciais para a realização desse trabalho, já que acreditaram e patrocinaram meus sonhos. Dedico também este trabalho ao meu noivo Filipe que me apoiou e permaneceu por perto durante todos os problemas, sempre com muita paciência. Amo muito vocês!

À FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro, fundamental para realização deste trabalho.

RESUMO

Prates, M. C. M. **Codeteção de bactérias em pacientes com Adenoamigdalite Crônica**. 2015. 55f. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

As tonsilas palatinas e adenoides são órgãos linfoides epiteliais do trato respiratório superior, onde ocorre o primeiro contato entre antígenos inalados e células de defesa do hospedeiro. O tecido adenoamigdaliano está em contato constante com uma grande diversidade de bactérias e vírus, que se reflete na elevada taxa de detecção de patógenos bacterianos e virais nesses tecidos, mesmo que saudáveis. Infecções crônicas ou repetidas nas mucosas dos tecidos linfoides podem desencadear o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico e a presença de hiperplasia tecidual. Esse estado está associado com inúmeras complicações como rinossinusites de repetição, ronco, obstrução nasal, disfunção da tuba auditiva, apnéia obstrutiva do sono, otite média, alterações do desenvolvimento facial, desenvolvimento comportamental. Por isso, este trabalho tem como objetivo principal analisar co-deteções das principais bactérias da microbiota respiratória humana (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa*) de pacientes com e sem adenoamigdalite crônica através da técnica de PCR em tempo real. Tivemos como principal bactéria detectada em nosso estudo *H. influenzae*, que foi encontrada em altos níveis na amígdala e adenoide. Já nas secreções, a bactéria de maior frequência encontrada foi *S. pneumoniae*. Os resultados de comparação entre os 2 grupos (pacientes com a doença e sem a mesma) não foram estatisticamente significantes, porém não menos importante, mostrando que os principais agentes comensais que colonizam o trato aéreo superior (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*) são elevados em ambos os grupos, e que provavelmente não são fundamentais na fisiopatogenia da hipertrofia adenoamigdaliana/tonsilites de repetição. Como conclusão podemos observar que as bactérias *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* tiveram altas frequências de detecção em amígdalas, adenoides e lavados nasofaríngeo de crianças sem hipertrofia tonsilar e sintomatologia de infecção respiratória. Além disso, não houve maiores frequências de detecção de bactérias presentes na microbiota em pacientes com hipertrofia tonsilar do que em controles e diferentemente das demais bactérias, houve concordância moderada ou boa nas detecções de *M. catarrhalis* e *H. influenzae* entre adenoide e amígdala de indivíduos sem sintomas respiratórios.

Palavras-chave: Bactéria; Adenoamigdalite crônica; PCR em tempo real.

ABSTRACT

Prates, M. C. M. **Codetection of bacteria in patients with chronic adenotonsillitis**. 2015. 55f. Dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The tonsils and adenoids are lymphoid epithelial organs of the upper respiratory tract, where the first contact between inhaled antigens and host defense cells occurs. In fact, the adenoid and tonsillar tissue is in constant contact with a wide variety of bacteria and viruses, which is reflected in the high rate of detection of bacterial and viral pathogens in these tissues, even if healthy. Chronic or recurrent infections of mucosal lymphoid tissues may trigger the development of a chronic inflammatory condition and the presence of tissue hyperplasia. This condition is associated with numerous complications such as rhinosinusitis repeat, snoring, nasal congestion, Eustachian tube dysfunction, obstructive sleep apnea, otitis media, abnormal facial development, behavioral development. Therefore, this study aims to analyze co-detections of the major human respiratory microbiota bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Pseudomonas aeruginosa*) in patients with and without chronic adenoamigdalite using the technique of real time PCR. We had the main bacteria detected in our study *H. influenzae*, which was found in high levels in the amygdala and adenoids. Already in the secretions, the bacterium most frequently found was *S. pneumoniae*. In conclusion we can see that the bacteria *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, and *S. pneumoniae* had high frequency of detection in amígdalas, adenoids and nasopharyngeal washed children without tonsillar hypertrophy and symptoms of respiratory infection. In addition, there were no major frequency detection of bacteria present in the microbiota in patients with tonsillar hypertrophy than in controls, and unlike the other bacteria, there was moderate to good agreement in the detection of *M. catarrhalis* and *H. influenzae* between adenoid and amígdala of individuals without respiratory symptoms.

Keywords: Bacteria; Chronic Adenoamigdalite; Real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anel linfático de Waldeyer. Faringe aberta por trás 1 = vegetações adenoides 2 = amígdala tubária 3 = fosseta de Rosenmuller 4 = orifício tubário 5 = coana direita 6 = borda posterior do septo 7 = amígdala palatina 8 = amígdala lingual 9 = epiglote 10 = laringe 11 = parede da faringe 12 = véu palatino 13 = rede de folículos linfáticos 14 = cauda do corneto inferior 15 = corneto superior 16 = esôfago. (COIFAN & TREVIZAN, 2010).....	1
Figura 2. Visão macroscópica de amígdala hipertrófica grau IV. Caso atendido no Centro do respirador bucal do HC_FMRP-USP.	3
Figura 3. Visão endoscópica da rinofaringe de uma paciente com hipertrofia adenoideana obstruindo 100%.	3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração por CFU/ml do estoque bacteriano	8
Tabela 2. Sequências de <i>primers</i> e sondas para genomas bacterianos.	12
Tabela 3. Valores de concordância Kappa.	13
Tabela 4. Detecção bacteriana de pacientes controle e com doença tonsilar crônica em tecidos e lavados.....	14
Tabela 5. Análise de concordância entre sítios diferentes dos pacientes do grupo controle.	15
Tabela 6. Análise de concordância de detecção de bactérias ente diferentes amostras de pacientes com doença tonsilar.	16
Tabela 7. Análise de concordância de detecção de bactérias entre diferentes amostras de pacientes com grau máximo de hipertrofia.	18
Tabela 8. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.	33
Tabela 9. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.	33
Tabela 10. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	33
Tabela 11. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	34
Tabela 12. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	34
Tabela 13. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	34
Tabela 14. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	34
Tabela 15. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	35
Tabela 16. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	35
Tabela 17. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e ADN em pacientes com doença tonsilar crônica.	35
Tabela 18. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	35
Tabela 19. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	36
Tabela 20. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	36
Tabela 21. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	36
Tabela 22. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	36
Tabela 23. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	37
Tabela 24. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	37

Tabela 25. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	37
Tabela 26. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	37
Tabela 27. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	38
Tabela 28. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	38
Tabela 29. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	38
Tabela 30. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	38
Tabela 31. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	39
Tabela 32. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	39
Tabela 33. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	39
Tabela 34. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	39
Tabela 35. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	40
Tabela 36. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	40
Tabela 37. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre ADN e LNF em pacientes com doença tonsilar crônica.	40
Tabela 38. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	40
Tabela 39. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	41
Tabela 40. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	41
Tabela 41. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	41
Tabela 42. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	41
Tabela 43. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	42
Tabela 44. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	42
Tabela 45. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	42
Tabela 46. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	42
Tabela 47. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e ADN em pacientes do grupo controle.	43

Tabela 48. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.	43
Tabela 49. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.	43
Tabela 50. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.....	43
Tabela 51. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.	44
Tabela 52. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.....	44
Tabela 53. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.	44
Tabela 54. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.....	44
Tabela 55. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.	45
Tabela 56. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e LNF em pacientes do grupo controle.....	45
Tabela 57. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	45
Tabela 58. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	45
Tabela 59. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	46
Tabela 60. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	46
Tabela 61. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	46
Tabela 62. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.....	46
Tabela 63. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	47
Tabela 64. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.....	47
Tabela 65. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.	47
Tabela 66. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre ADN e LNF em pacientes do grupo controle.....	47
Tabela 67. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	48
Tabela 68. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	48
Tabela 69. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	48
Tabela 70. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	48

Tabela 71. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	49
Tabela 72. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	49
Tabela 73. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	49
Tabela 74. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	49
Tabela 75. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	50
Tabela 76. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e ADN em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	50
Tabela 77. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	50
Tabela 78. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	50
Tabela 79. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	51
Tabela 80. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	51
Tabela 81. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	51
Tabela 82. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	51
Tabela 83. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	52
Tabela 84. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	52
Tabela 85. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	52
Tabela 86. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre AMG e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	52
Tabela 87. Estatística de concordância de detecção de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	53
Tabela 88. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. aureus</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	53
Tabela 89. Estatística de concordância de detecção de <i>S. pneumoniae</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	53
Tabela 90. Valor do coeficiente Kappa de <i>S. pneumoniae</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	53
Tabela 91. Estatística de concordância de detecção de <i>H. influenzae</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	54
Tabela 92. Valor do coeficiente Kappa de <i>H. influenzae</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	54
Tabela 93. Estatística de concordância de detecção de <i>P. aeruginosa</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	54

Tabela 94. Valor do coeficiente Kappa de <i>P. aeruginosa</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	54
Tabela 95. Estatística de concordância de detecção de <i>M. catarrhalis</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	55
Tabela 96. Valor do coeficiente Kappa de <i>M. catarrhalis</i> entre ADN e LNF em pacientes com grau máximo de hipertrofia.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

IgA: Imunoglobulina do tipo A

RNase: Tipo de nuclease que catalisa a degradação do RNA.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

DEPC: Dicarbonato de dietila

qPCR: PCR quantitativo

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epitélio e tecido	1
1.2. Hipertrofia adenoamigdaliana.....	2
1.3. Microbiotas	4
1.4. Invasão de tonsila por micróbio.....	5
2. OBJETIVO.....	7
2.1. Objetivos gerais.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Padronização dos controles	7
3.1.1. Ensaio de formação de colônias - CFU	8
3.1.2. Extração do genoma bacteriano	8
3.2. Amostras clínicas.....	9
3.2.1. Maceração das amostras clínicas.....	10
3.2.2. Extração de DNA	11
3.2.3. PCR em tempo real	11
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÕES	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epitélio e tecido

O anel linfático de Waldeyer é composto pela adenoide, conectada à parede posterior da faringe; pela amígdala tubária situada nos óstios faríngeos do tubo de Eustáquio; pelas tonsilas palatinas localizadas na orofaringe, e pela tonsila lingual, no palatoglosso. Os tecidos que compõem o anel de Waldeyer fazem parte do MALT (tecido linfoide associado às mucosas) e fazem parte da defesa imune contra patógenos. (Hellings *et al.*, 2000; Brandtzaeg, 2003).

Na transição entre a orofaringe e a boca estão localizadas as tonsilas palatinas. Elas compartilham entrada comum aos tratos respiratório e gastrointestinal e nelas se inicia a resposta imune contra agentes que têm como porta de entrada o nariz e a boca (Brandtzaeg e Halstensen, 1992).

Figura 1. Anel linfático de Waldeyer. Faringe aberta por trás 1 = vegetações adenoides 2 = amígdala tubária 3 = fossa de Rosenmüller 4 = orifício tubário 5 = coana direita 6 = borda posterior do septo 7 = amígdala palatina 8 = amígdala lingual 9 = epiglote 10 = laringe 11 = parede da faringe 12 = véu palatino 13 = rede de folículos linfáticos 14 = cauda do corneto inferior 15 = corneto superior 16 = esôfago. (COIFAN & TREVIZAN, 2010).

As tonsilas palatinas são revestidas por um epitélio estratificado escamoso não queratinizado e envolto por uma cápsula composta por tecido conjuntivo contendo nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Casamayor-Palleja *et al.*, 2001). A tonsila palatina (Brandtzaeg, 1996) se localiza na fossa tonsilar entre os arcos palatoglossos e palatofaríngeos. A fossa tonsilar tem como base o palatofaríngeo localizado dorsalmente, o palatoglosso

ventralmente e lateralmente é encontrado o músculo constritor superior da farínge (Quiding *et al.*, 1995).

As amígdalas tem a capacidade de formar criptas profundas (Scadding, 1990), que são contendo células degeneradas e restos celulares. Seu epitélio é uma forma alterada do epitélio escamoso estratificado que reveste a orofaringe e o exterior da amígdala. Células B e T estão espessadas no epitélio, assim como macrófagos e células dendríticas (Nave *et al.*, 2001)

Os folículos linfoides primários são formados na 16ª semana de gestação e após o nascimento surgem os centros germinativos (Brandtzaeg, 1999). Os folículos são arredondados e se localizam abaixo do epitélio, e neles ocorre a maturação e diferenciação de linfócitos B e ativação dos linfócitos T. Os folículos secundários contendo centro germinativo são compostos por 3 regiões, zona escura (grande número de blastos B), zona clara (contendo centrócitos) e a zona do manto (com células B virgens) (Mattila e Tarkkanen, 1998). Na parte externa do folículo há células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e vênulas (Bergler *et al.*, 1999).

Durante a infância as amígdalas atingem tamanho diretamente proporcional à quantidade de células B e T (Casamayor-Palleja *et al.*, 2001).

A adenoide é um tecido linfoepitelial, associado à nasofaringe. (Kuper *et al.*, 1992).

O epitélio da adenoide é colunar pseudoestratificado e inclui células M que internalizam agentes patogênicos e formam uma linha defesa contra antígenos que são transportados e apresentados para linfócitos (Ogasawara *et al.*, 2011). Células M encontra-se em locais diversificados em tecidos linfoides do trato digestório e respiratório (Gebert, 1997).

O epitélio apresenta impermeabilização originada por junções apicais, em sua maioria “tight junctions (Schleimer *et al.*, 2007). Essas junções separam a porção apical da superfície basolateral mantendo a polaridade, bloqueando o fluxo do espaço paracelular (Gumbiner, 1993). Essas junções podem estar relacionadas a mecanismos de transdução de sinais que controlam a proliferação de células epiteliais, expressão gênica e diferenciação (Balda e Matter, 2009).

1.2. Hipertrofia adenoamigdaliana

Infecções crônicas ou repetidas nas mucosas dos tecidos linfoides podem desencadear um estado inflamatório crônico e hiperplasia tecidual (Endo *et al.*, 2002) (Figura 2a e b). Esse estado associado-se com inúmeras complicações, como rinossinusites de repetição, ronco, obstrução nasal, disfunção da tuba auditiva, apneia obstrutiva do sono, otite média, alterações

do desenvolvimento facial, desenvolvimento comportamental, (Kurnatowski *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2009), além de afetar a saúde periodontal das crianças (Demir *et al.*, 2013).

Figura 2. Visão macroscópica de amígdala hipertrófica grau IV. Caso atendido no Centro do respirador bucal do HC_FMRP-USP.

Figura 3. Visão endoscópica da rinofaringe de uma paciente com hipertrofia adenoideana obstruindo 100%.

A despeito de sua grande relevância em saúde pública, pouco se sabe sobre os fatores associados à gênese da hipertrofia crônica de amígdalas e adenoides. Infecções virais crônicas são ótimos candidatos, uma vez que constituintes desses agentes podem funcionar como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). A estimulação crônica por PAMPs via receptores de reconhecimento padrão (PRR) com ativação da resposta imune inata, resultante principalmente na produção de interferon do tipo I, induz a transcrição de genes estimulados por interferon (INF), citocinas e quimiocinas inflamatórias. O recrutamento de células em decorrência desse estado inflamatório crônico pode resultar no aumento de células linfoides e

centros germinativos, característicos da hiperplasia e hipertrofia das tonsilas. Além disso, alguns vírus são capazes de inibir a apoptose em células da amígdala, que também pode estar associado a hipertrofia amigdaliana (Lopez-Gonzalez *et al.*, 1999).

Estudo feito com pacientes de 2 a 16 anos de idade diagnosticados com adenoamigdalite hipertrófica sintomática receberam durante 30 dias de tratamento com amoxicilina e clavulanato de potássio. Após 30 dias houve diminuição de 40% no número de pacientes com indicação cirúrgica. Porém, essa redução diminuiu com o passar do tempo e chegou a 32% em 3 meses (Sclafani *et al.*, 1998).

Pacientes com significante hipertrofia são submetidos a tonsilectomia, um dos procedimentos cirúrgicos pediátrico mais realizado em todo o mundo (Erdag *et al.*, 2005), (Ying, 1988). Os benefícios pós-cirúrgico incluem melhora da qualidade do sono, comportamento e desenvolvimento cognitivo da criança (Mitchell e Kelly, 2005; Wei *et al.*, 2009). Porém ainda não é certo se os benefícios superam os males, já que ocorre uma diminuição de células imunocompetentes e redução da IgA sérica (Brandtzaeg, 1999).

1.3. Microbiotas

A microbiota traz benefícios aos animais, estimula o sistema imune aumentando a resistência contra agentes patogênicos (Crowe *et al.*, 1973; Smith *et al.*, 2007).

Bactérias colonizam as mucosas de superfície do corpo depois do nascimento (Grice e Segre, 2011). O recém-nascido adquire bactérias comensais e o trato respiratório superior torna-se habitado por várias espécies (Rotimi e Duerden, 1981). A variedade de microrganismos é influenciada por vários fatores, entre eles a idade, o status econômico, uso de antibiótico, vacinação, tabagismo, entre outros (Garcia-Rodriguez e Fresnadillo Martinez, 2002).

A flora da nasofaringe se estabelece durante o primeiro ano de vida (Faden *et al.*, 1995; Faden *et al.*, 1997). As frequências de transportadores dessas bactérias variam entre estudos e localizações (Faden *et al.*, 1995; Faden *et al.*, 1997; Zalacain *et al.*, 1999), assim como background genético, condições sócio-econômicas (tamanho da família, creche, habitação, cuidados com saúde) (Garcia-Rodriguez e Fresnadillo Martinez, 2002).

Múltiplos fatores estão relacionados com a colonização por microrganismos e o sistema imunológico tem papel importante na presença de patógenos no trato respiratório superior (Faden *et al.*, 1995). Embora a relação microbiota e hospedeiro em geral não seja danosa ao último, ela pode se tornar prejudicial (Pamer, 2007). Interações organismo-hospedeiro se dão pela ligação de proteínas de superfície do agente com receptores celulares e a imunidade de

mucosa pode reduzir uma colonização por micróbios de forma mais eficiente que a imunidade sistêmica, que amadurece mais tardiamente (Ghaffar *et al.*, 1999).

Colonização de mucosa é um processo dinâmico e múltiplas espécies de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* podem coexistir, mas certas cepas de *S. aureus* impedem estabelecimentos de colonização por uma nova cepa (Margolis *et al.*, 2010).

Interessantemente, *H. influenzae* pode proteger *M. catarrhalis* pelas liberações de proteínas presentes em vesículas da membrana, que irão desativar o componente C3 do complemento (Tan *et al.*, 2007).

Portanto, as interações entre diferentes micro organismos e inclusive vírus resultam em um equilíbrio de diversos componentes da microbiota (Pettigrew *et al.*, 2011).

1.4. Invasão de tonsila por micróbio

Amigdalite aguda, acontece quando a quantidade de patógenos supera a capacidade de defesa imune (Scadding, 1990).

A maior atividade imunológica da amígdala acontece de 3 a 10 anos (Quiding *et al.*, 1995) ocorre diminuição de quantidade de células B e de repertório de células T na tonsila palatina após 60 anos de idade (Surjan, 1987).

Infecções por vários tipos de microrganismos podem levar ao aumento do tecido de amígdala e adenoide, (Hellings *et al.*, 2000; Brandtzaeg, 2003; Jabbari Moghaddam *et al.*, 2009). Os antígenos são transportados através do epitélio pelas células membranosas (M) e atingem um tecido com altas concentrações de linfócitos, macrófagos e células dendríticas (Van Kempen *et al.*, 2000). Em localização intraepitelial, há linfócitos B e linfócitos T que sintetizam uma gama de diferentes citocinas como IL2, IL4, IL6, TNF-alfa e TNF-beta (Quiding *et al.*, 1995) (Ogasawara *et al.*, 2011).

Os antígenos microbianos atravessam o epitélio da cripta em direção ao folículo linfoide, por mecanismos poucos conhecidos.. Estudo feito por Casamayor-Palleja sugere que essa entrada influem citocinas e quimiocinas sintetizadas nas criptas, que têm a função de atrair células B de memória, responsáveis pela retenção desses antígenos nas criptas (Casamayor-Palleja *et al.*, 2001). Na região extrafolicular, os antígenos são apresentados aos linfócito T (Brandtzaeg e Halstensen, 1992). Linfócitos B proliferam e à medida que migram da zona escura para a de clara, expressam anticorpos (Brandtzaeg, 1996). Esse contato das células B com antígenos é essencial para a resposta imune secundária (Quiding-Jarbrink *et al.*, 1995).

Embora em quantidade limitada, células T nos folículos são essenciais, pois expressam citocinas como a IL-4 que irá inibir a apoptose de células B (Schriever *et al.*, 1997).

A detecção por PCR quantitativo de bactérias em tecidos tonsilares permite verificar a existência de correlação entre quantidade de certas bactérias e hipertrofia tonsilar. No presente estudo, usamos PCR em tempo real para as bactérias *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* em tonsilas de pacientes com hipertrofia tonsilar submetidos a tonsilectomia.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo principal analisar detecções genômicas das principais bactérias patogênicas componentes da microbiota respiratória humana (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa*) em tonsilas de pacientes com e sem doença tonsilar crônica.

2.2. Objetivos específicos

- Produção de estoques bacterianos de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- Padronização das concentrações de “primers” e sondas, e limites de detecções dos genomas bacterianos pela técnica de PCR em tempo real por metodologia TaqMan®.
- Detecção por PCR em tempo real por metodologia TaqMan® das bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa* em tecidos de pacientes com ou sem doença adenotonsilar crônica.
- Verificar a existência de correlações entre padrões de detecções bacterianas e hipertrofia tonsilar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Padronização dos controles

Para realizar o ensaio de CFU (unidade formadora de colônia), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* estocadas em freezer -80°C com glicerol foram semeadas em meios de cultura para que pudessemos observar sua viabilidade. As bactérias estoque foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado, como segue:

- *Staphylococcus aureus*: Ágar Sangue
- *Moraxella catarrhalis*: Ágar Sangue
- *Pseudomonas aeruginosa*: Mac Conkey
- *Haemophilus influenzae*: Ágar Chocolate
- *Streptococcus pneumoniae*: Ágar Sangue

Para cada bactéria foi semeado 100µL de cultura por esgotamento com alça de Drigalski flambada e em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C até o surgimento de colônias. No caso do *Haemophilus influenzae* que estava liofilizado, este foi

cultivado em caldo BHI (*brain heart infusion*) antes de ser semeado. Após a obtenção de colônias, foi pipetado 4mL de caldo BHI (*brain heart infusion*) na placa e com o auxílio de um *scraper* estéril as colônias foram raspadas e 1ml da bactéria foi armazenado com 10% de glicerol em tubos de 1,5mL a -80°C e 1mL foi armazenado em tubos de 1,5ml a -20°C.

No caso da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, a recuperação foi obtida com meio STGG composto de 2% de leite desnatado, 3% de triptoma, 0,5% de glicose e 10% de glicerol e a bactéria foi armazenada em freezer -80°C com 15% desse meio mais 15% de glicerol.

3.1.1. Ensaio de formação de colônias - CFU

A cultura armazenada a -80°C foi utilizada para a realização das diluições de 10^{-1} a 10^{-7} em caldo BHI, seguido de plaqueamento das mesmas. Para plaquear essas diluições foi colocado 1ml de cada uma em seu respectivo meio de cultura. O líquido foi espalhando de forma homogênea por meio de movimentos circulares com a placa. Nesta etapa não foi utilizada alça de Drigalski, pois para realizar a quantificação, nenhuma quantidade de bactéria poderia ser perdida. As placas foram incubadas em estufa a 37°C.

Tabela 1. Concentração por CFU/ml do estoque bacteriano

Bactéria	Concentração
<i>Staphylococcus aureus</i>	$6,32 \times 10^{10}$ CFU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3,45 \times 10^{10}$ CFU
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$3,52 \times 10^{10}$ CFU
<i>Haemophilus influenzae</i>	$2,02 \times 10^9$ CFU
<i>Moraxella catarrhalis</i>	$6,25 \times 10^9$ CFU

3.1.2. Extração do genoma bacteriano

Para a obtenção do DNA genômico das bactérias gram-positivas e gram-negativas, foi utilizado o kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, USA).

Para cada bactéria, foi adicionado 1ml de uma cultura *overnight*, a um tubo de 1,5ml seguido de centrifugação a 13.000-16.000g por 2 minutos para a obtenção do *pellet* de células. O sobrenadante foi removido.

As células foram ressuspensas em 480µl de EDTA 50Mm e 40µl de protease (fornecido pelo Kit), homogenizadas com a ponteira e a suspensão foi incubada a 37°C por uma hora. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 13.000-16.000g e o sobrenadante foi removido.

Em seguida foi adicionado 600µl de *Nucleic Lysis Solution* e incubado a 80°C em banho seco por 5 minutos e depois resfriado em temperatura ambiente. Acrescentou-se então,

3µl de RNase e o tubo foi invertido 5 vezes para misturar a solução e incubação a 37°C por 1 hora, depois resfriamento a temperatura ambiente.

Após esta etapa, foi adicionado 200µL de *Protein Precipitation Solution* às células já tratadas com RNase e foram colocado no vortex à velocidade máxima por 20 minutos, seguido de 5 minutos no gelo. A solução foi centrifugada por 3 minutos a 13.000-16.000g, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5ml contendo 600µl de isopropanol e misturado por inversão.

Os tubos foram novamente centrifugados a 13.000-16.000g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado em um papel absorvente. Foi adicionado 600uL de álcool a 70% e os tubos foram invertidos várias vezes para “lavar” o *pellet* de DNA e centrifugados a 13.000-16.000g por 2 minutos. Cuidadosamente, o etanol foi aspirado e os tubos foram drenados sobre papel absorvente para secar o *pellet* por 10 a 15 minutos.

Foi adicionado 100ul de *DNA Rehydration Solution* para a reidratação do DNA e incubado a 65°C por 1 hora com agitação periódica. Alternativamente, o DNA foi reidratado incubando a solução *overnight* à temperatura ambiente ou a 4°C. O DNA das bactérias foi armazenado a 2-8°C até o momento do uso.

3.2. Amostras clínicas

O estudo foi feito de maio de 2010 a agosto de 2012, e incluiu crianças de 2 a 12 anos (média: 6 anos de idade) diagnosticadas com doença tonsilar hipertrófica crônica. As crianças foram avaliadas na Divisão de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da de Ribeirão Preto na da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, Brasil, um hospital terciário de ensino médico. A avaliação desses pacientes baseou-se em exames clínicos, avaliação otoscópica, imitanciometria e endoscopia nasal. Os graus de hipertrofia adenoamigdaliana considerados foram 2 (aquelas que ocupam até 50% da largura da orofaringe), 3 (as amígdalas ocupam até 75% da largura da orofaringe) ou 4 (ocupam mais de 75% da largura da orofaringe). Foram considerados de grau máximo os pacientes com graus 3 e 4.

O grupo controle foi composto de 14 crianças de 2 a 12 anos de idade (média: 4,1 anos de idade), submetidos a selecionados para a cirurgia para colocação de implante coclear, sem histórico de hipertrofia adenoamigdaliana.

Crítérios de exclusão foram a presença de sintomas de infecção aguda das vias aéreas superiores no período de quatro semanas anteriores à cirurgia, e presença de síndromes genéticas que podem interferir na respiração e fisiologia da tuba de Eustáquio. Nesse período, amostras de tecidos de 37 crianças submetidos a cirurgia foram disponíveis para o estudo.

Todos os pacientes ou responsáveis assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (processo número 10466/2008).

Grupo de estudo: após a retirada da adenoide e amígdala, os tecidos foram separados em duas partes. A primeira secção foi encaminhada para análise patológica de rotina seguindo os protocolos do hospital. A segunda parte foi colocada em MEM (meio essencial mínimo de Eagle com 10% de soro fetal bovino (Gibco EUA) e 15% + antibióticos solução antimicótica contendo 20000 U / ml de penicilina-estreptomicina e 200 ng / ml de anfotericina B. O uso do antibiótico que inibe a proliferação bacteriana no tecido extirpado não interfere mascarando os resultados uma pois a qPCR detecta e quantifica genomas bacterianos originalmente presentes na amostra, independente da viabilidade da bactéria.

Grupo controle: essas amostras foram de pacientes submetidos a colocação de implante coclear. Após a intubação orotraqueal, foi colocado um afastador palatar permitindo colher uma biópsia por “punch” da tonsila faríngea, seguindo-se hemostasia. Esse fragmento de tecido também foi adicionado em MEM e tratado da mesma forma descrita para o grupo de estudos.

Todas as amostras, tanto do grupo de estudo como dos controles, foram logo transportadas do hospital até o laboratório sobre gelo, sendo processadas até 2 horas para o processamento e testes.

No laboratório, foram realizadas duas lavagens com MEM, removendo assim restos celulares e sangue. Com uma pinça, o material foi retirado do tubo e colocado em uma Placa de Petri. Com a pinça e um bisturi, as amostras foram cortadas. O fragmento de tecido foi dividido em duas metades. Um pedaço foi colocado em Trizol® (Invitrogen) para realização da extração de ácidos nucleicos e outro pedaço foi armazenado como *backup* congelado em nitrogênio líquido.

3.2.1. Maceração das amostras clínicas

Para macerar os tecidos, foram adicionados 200µL de água DEPC na proporção de cada 400mL de H₂O destilada para 100µL de DEPC. Com um triturador (politron) as amostras foram maceradas.

No caso dos lavados nasofaríngeos, a cada 250µL de amostra, foram adicionados 750µL de Trizol®. Além disso, foi preparado outro tubo com 500µL de lavado em 500µL de meio de congelamento e um tubo de 1,5mL do lavado puro, que foram congelados em freezer -70°C.

3.2.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA, o tubo com Trizol®. Foi incubado por 5 minutos a 15-30°C para permitir a dissociação completa de complexos nucleoprotéicos.

Foi adicionado 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol® e os tubos foram agitados na mão por 15 segundos.

As amostras foram a seguir incubadas por 2 minutos a 15-30°C e depois centrifugadas a 12.000g por 15 minutos, a 8°C, essa temperatura foi usada para diminuir a atividade catalítica enzimática, mantendo a integridade do material genético. Após a centrifugação, apareceram três fases nos tubos, sendo uma camada na porção inferior do tubo (clorofórmio), uma interfase e uma camada aquosa, sem cor, na porção superior do tubo. O RNA é mais abundante na fase aquosa e o DNA na interfase. A remoção cuidadosa da fase aquosa foi feita e o DNA foi isolado a partir da interfase e pela adição de 300µL de etanol 100% com agitação homogeneização. As amostras foram incubadas 2-3 minutos em temperatura ambiente e a seguir centrifugadas a 2000 × g durante 5 minutos a 4° C para sedimentar o DNA. O sobrenadante foi removido e o sedimento de DNA foi lavado com 1mL de solução de citrato de sódio em etanol (0,1 M de citrato de sódio em etanol a 10%, pH 8,5) e durante 30 minutos, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente e misturadas ocasionalmente por inversão suave. Foi realizada centrifugação a 2000 × g durante 5 minutos a 4° C seguida de eliminação do sobrenadante. Realizou-se o procedimento de lavagem do sedimento de DNA com citrato de sódio novamente, com nova incubação por 30. Foi realizada a centrifugação a 2000 × g durante 5 minutos a 4° C e o sobrenadante foi descartado.

Acrescentou-se 1mL de etanol a 75% por cada 1 mL de Reagente TRIzol®. Foi feita a incubação do sedimento durante 10-20 minutos à temperatura ambiente, seguido da mistura do tubo ocasionalmente por inversão suave, seguindo-se centrifugação a 2000 × g durante 5 minutos a 4° C com eliminação do sobrenadante. O sedimento de DNA foi secado durante 5-10 minutos

O DNA foi ressuscitado em 1mL de NaOH 8 mM a uma concentração de 0,2-0,3 mg/mL por 50-70 mg de tecido. Todo o material insolúvel foi removido por centrifugação da amostra a 12000 × g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo e armazenado em freezer -20° C.

3.2.3. PCR em tempo real

Foi feita a qPCR em tempo real, para detectar e quantificar DNA de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catharralis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *H.*

influenzae.. Foi otimizado o ensaio de PCR em Tempo Real em termociclador 7.300 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) e Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), nas seguintes condições de amplificação: 50° C por 2 minutos – 95° C por 10 minutos – 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto por 45 ciclos.

Foi utilizado 9µl do produto de DNA obtido da extração, 0,25µl dos *primers* 0,125µl de sonda, e 5µl do tampão de amplificação TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems® Foster City, CA, USA).

Tabela 2. Sequências de *primers* e sondas para genomas bacterianos.

BACTÉRIAS	PRIMERS	SONDAS	REFERÊNCIAS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5'TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT 3' (FORWARD) 5'CTCTTACTCGTGGTTTCCAAC TGA3'	FAM 5'TGGCGCCCATAGCAACA CTCGAA-Tamra 3' TAMRA	(Corless <i>et al.</i> , 2001)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5'GTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTT GTA 3' (FORWARD) 5'AATGTCGCAGGTTCTTTATGTAA TTT 3' (REVERSE)	5'-VIC- AAGTCTAAGTAGCTCAGCA AATGCA- MGB- 3'	(Kilic <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5'CGAGTACAACATGGCTCTGG 3' (FORWARD) 5'ACCGGACGCTCTTTACCATA 3'(REVERSE)	5'-FAM- CCTGCAGCACCAGGTAGCG C-Tamra-3'	(Feizabadi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Haemophilus influenzae</i>	5'CCAGCTGCTAAAGTATTAGTAG AAG 3'(FORWARD) 5'TTCACCGTAAGATACTGTGCC 3'(REVERSE)	5'-VIC- CAGATGCAGTTGAAGGTTA TTTAG -MGB-3'	(Abdeldaim <i>et al.</i> , 2009)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	5'GTCAAACAGCTGGAGGTATTGC 3'(FORWARD) 5'GACATGATGCTCACCTGCTCTA 3'(REVERSE)	5'-NED- ATCGCAATTGCAACTTT- MGB-3'	(Heiniger <i>et al.</i> , 2007)

A partir do resultado obtido foi possível determinar a quantidade, em número de moléculas, que estava presente em diluições decimais dessas bactérias, e assim construir uma curva padrão. A curva padrão foi construída a partir de 7 diluições decimais seriadas para cada bactéria.

A curva padrão possibilitou, por extrapolação, o cálculo do número de cópias/mL das bactérias estudadas nos experimentos realizados. Os resultados foram analisados com o software 7300 System com base no valor do Ct (*Cycle threshold*). Esse valor é o ponto da curva de amplificação de uma dada amostra que corresponde ao número de ciclos em que é atingido o limiar de detecção da fluorescência emitida durante a fase exponencial da PCR em tempo real.

Para as análises estatísticas, foi utilizado teste de concordância Kappa baseado nos seguintes valores: (tabela 3).

Tabela 3. Valores de concordância Kappa.

Valores de concordância Kappa
se negativo, não há concordância alguma
se entre <0.20 - concordância muito pobre
entre 0.20 até 0,39 - concordância pobre
entre 0,40 e 0,59 - concordância moderada
entre 0,60 e 0,79 - concordância boa
acima de 0,80 - concordância ótima

4. RESULTADOS

Analisando as detecções de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* em amígdalas, adenoide e lavado nasofaríngeo de 37 pacientes com hipertrofia tonsilar crônica e 14 pacientes controle, obtivemos os dados resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Detecção bacteriana de pacientes controle e com doença tonsilar crônica em tecidos e lavados.

Bactéria	Detecção nas amígdalas		Detecção nas adenoides		Detecção nos lavados nasofaríngeos		Total de detecção bacteriana	
	Controle (%)	Paciente (%)	Controle (%)	Paciente (%)	Controle (%)	Paciente (%)	Controle (%)	Paciente (%)
<i>S. aureus</i>	0 (0)	3 (8,1)	2 (14,2)	1 (2,7)	0 (0)	4 (10,8)	2 (14,2)	6 (16,2)
<i>S. pneumoniae</i>	4 (28,6)	19 (51,3)	9 (64,2)	21 (56,7)	11 (78,5)	26 (70,2)	12 (85,7)	29 (78,3)
<i>H. influenzae</i>	8 (57,1)	24 (64,8)	9 (64,2)	16 (43,2)	10 (71,4)	26 (70,2)	12 (85,7)	30 (81)
<i>P. aeruginosa</i>	4 (28,6)	6 (16,2)	2 (14,2)	8 (21,6)	2 (14,2)	9 (24,3)	6 (42,8)	17 (45,9)
<i>M.catarrhalis</i>	3 (21,4)	6 (16,2)	4 (28,5)	15 (40,5)	7 (50)	20 (54)	7 (50)	21 (56,7)

As frequências totais de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* e *M. catarrhalis* nos grupos de adenoamigdalite crônica e controles não apresentaram diferença significativa.

Para verificar se havia concordância na detecção bacteriana entre os três diferentes espécimes, foram comparadas as frequências de cada bactéria nos três espécimes do estudo em amígdala, adenoide e lavado. A análise foi iniciada pelos 14 pacientes do grupo controle, utilizando a análise de concordância Kappa. (tabela 5).

Tabela 5. Análise de concordância entre sítios diferentes dos pacientes do grupo controle.

Bactéria	Comparação	Coefficiente Kappa	IC 95%
<i>S. aureus</i>	Amígdala x Adenoide	0	(-1,04; 1,04)
	Adenoide x Lavado	0	(-1,04; 1,04)
<i>S. pneumoniae</i>	Amígdala x Adenoide	-0,1455	(-0,5712; 0,2802)
	Adenoide x Lavado	0,3171	(-0,1899; 0,8241)
	Amígdala x Lavado	0,1967	(-0,0539; 0,4473)
<i>H. influenzae</i>	Amígdala x Adenoide	0,6829	(0,2996; 1,0000)
	Adenoide x Lavado	0,4179	(-0,1244; 0,9602)
	Amígdala x Lavado	0,087	(-0,4156; 0,5895)
<i>P. aeruginosa</i>	Amígdala x Adenoide	-0,2353	(-0,4760; 0,0054)
	Adenoide x Lavado	-0,1667	(-0,3277; -0,0056)
	Amígdala x Lavado	0,1765	(-0,3573; 0,7103)
<i>M. catarrhalis</i>	Amígdala x Adenoide	0,4324	(-0,1001; 0,9649)
	Adenoide x Lavado	0,5714	(0,1830; 0,9598)
	Amígdala x Lavado	0,4286	(0,0402; 0,8170)

Quando a comparação entre amígdala e adenoide, houve concordância boa na detecção de *H. influenzae*, e concordância moderada de *M. catarrhalis* (tabela 5). Dentre os 9 controles, nos quais *H. influenzae* foi detectada em qualquer tecido, em sete pacientes ela foi detectada simultaneamente na amígdala e adenoide, e somente em 2 pacientes a bactéria foi detectada somente na adenoide (anexo II - Tabela 42). Dentre os 5 controles nos quais a *M. catarrhalis* foi detectada em qualquer sítio, em 2 pacientes houve concordância de positividade entre adenoide e amígdala, contra 2 pacientes nos quais a bactéria foi detectada somente em adenoide e 1 somente na amígdala. Em relação às demais bactérias, a concordância entre amígdala e adenoide foi pobre ou ausente.

A comparação entre amígdala e lavado nasofaríngeo revelou apenas concordância moderada entre as detecções de *M. catarrhalis* em amígdala e lavado nasofaríngeo. Dentre os

7 controles nos quais a bactéria foi detectada em amígdala ou lavado, 3 tinham a bactéria simultaneamente em ambos os materiais, enquanto em 4 pacientes a bactéria foi detectada somente no lavado nasofaríngeo (anexo II - Tabela 55). Em relação às demais bactérias, a concordância entre amígdala e lavado nasofaríngeo foi pobre ou ausente.

A comparação entre a adenoide e lavado nasofaríngeo mostrou concordância moderada nas detecções de *H. influenzae* e *M. catarrhalis*. Em relação a *H. influenzae*, dentre os 11 controles, 8 tinham a bactéria detectada simultaneamente em adenoide e lavado, contra 3 pacientes nos quais a bactéria foi detectada somente em adenoide ou lavado (anexo II – Tabela 61). Quanto à *M. catarrhalis* verificamos que dos 7 controles positivos para essa bactéria, 4 eram positivos simultaneamente em adenoide e lavado nasofaríngeo, enquanto 3 eram positivos somente na adenoide. Para as demais bactérias a concordância entre adenoide e lavado nasofaríngeo foi pobre ou ausente (anexo II - Tabela 65).

Passamos a seguir às análises de concordância de frequências de detecções bacterianas entre os 3 espécimes (amígdala, adenoide e lavado), nos 37 pacientes com hipertrofia adenotonsilar crônica, a análise de concordância Kappa (tabela 6).

Tabela 6. Análise de concordância de detecção de bactérias ente diferentes amostras de pacientes com doença tonsilar.

Bactéria	Concordância	Coefficiente Kappa	IC 95%
<i>S. aureus</i>	Amígdala x Adenoide	-0,0435	(-0,1098; 0,0228)
	Adenoide x Lavado	-0,0465	(-0,1218; 0,0287)
	Amígdala x Lavado	0,5277	(0,0599; 0,9954)
<i>S. pneumoniae</i>	Amígdala x Adenoide	0,132	(-0,1858; 0,4497)
	Adenoide x Lavado	0,5325	(0,2658; 0,7991)
	Amígdala x Lavado	0,4873	(0,2219; 0,7528)
<i>H. influenzae</i>	Amígdala x Adenoide	0,2725	(-0,0046; 0,5495)
	Adenoide x Lavado	0,2825	(0,0243; 0,5408)
	Amígdala x Lavado	0,3854	(0,0724; 0,6984%)
<i>P. aeruginosa</i>	Amígdala x Adenoide	0,2986	(-0,0725; 0,6696)
	Adenoide x Lavado	0,0082	(-0,3152; 0,3317)
	Amígdala x Lavado	-0,0761	(-0,3555; 0,2034)
<i>M. catarrhalis</i>	Amígdala x Adenoide	0,3183	(0,0437; 0,5928)
	Adenoide x Lavado	0,6273	(0,3876; 0,8671)
	Amígdala x Lavado	0,2825	(0,0761; 0,4890)

Primeiramente, foram feitas análises da concordância de detecção, entre amígdala e adenoide para todas as bactérias, mostrando pobre ou ausência de concordância (tabela 6).

Em seguida procedemos à análise de concordância entre tonsilas e lavados nasofaríngeos. Observamos que houve concordância moderada na detecção de *S. aureus* e *S.pneumoniae* (tabela 6). No caso da bactéria *S. aureus*, vimos que dentre os 5 pacientes nos quais a bactéria foi detectada em qualquer material, somente 2 pacientes tinham a bactéria em ambos os tecidos, amígdala e lavado, contra 4 pacientes nos quais a bactéria foi detectada somente em amígdala ou lavado. Quanto a *S. pneumoniae* observamos que dentre 27 doentes nos quais a bactéria foi detectada em qualquer dos materiais, 18 pacientes tinham a bactéria em ambos os tecidos, amígdala e lavado, contra 9 pacientes nos quais a bactéria foi detectada somente em amígdala ou lavado nasofaríngeo (anexo I - Tabela 20).

A seguir verificamos a concordância entre adenoide e lavado nasofaríngeo. Verificamos concordância boa para *M. catarrhalis*, pois dos 21 pacientes nos quais *M. catarrhalis* era detectável em adenoide ou lavado, 14 tinham a bactéria simultaneamente nos dois materiais, contra 6 pacientes somente no lavado e 1 somente na adenoide (anexo I - Tabela 36). Houve também concordância moderada entre as detecções de *S. pneumoniae* em adenoide e lavado nasofaríngeo, pois dos 27 pacientes que houve detecção desta bactéria, 19 tinham positividade simultaneamente nos dois materiais, contra 7 somente no lavado nasofaríngeo e 1 somente na adenoide.

Para as demais bactérias, a concordância entre adenoide e lavado nasofaríngeo foi pobre ou ausente.

Considerando que para algumas bactérias houve concordância moderada ou boa entre diferentes materiais, resolvemos verificar se essa concordância poderia ser mais intensa considerando apenas os 22 pacientes com maiores intensidades de hipertrofia (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de concordância de detecção de bactérias entre diferentes amostras de pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Bactéria	Concordância	Coefficiente Kappa	IC 95%
<i>S. aureus</i>	Amígdala x Adenoide	-0,0769	(-0,1958; 0,0419)
	Adenoide x Lavado	-0,0769	(-0,1958; 0,0419)
	Amígdala x Lavado	0,614	(0,1266; 1,0000)
<i>S. pneumoniae</i>	Amígdala x Adenoide	0,0833	(-0,3336; 0,5003)
	Adenoide x Lavado	0,5299	(0,1836; 0,8763)
	Amígdala x Lavado	0,5299	(0,1836; 0,8763)
<i>H. influenzae</i>	Amígdala x Adenoide	0,3937	(0,0567; 0,7307)
	Adenoide x Lavado	0,1538	(-0,1936; 0,5013)
	Amígdala x Lavado	0,5217	(0,1575; 0,8859)
<i>P. aeruginosa</i>	Amígdala x Adenoide	0,2281	(-0,3034; 0,7646)
	Adenoide x Lavado	0,0494	(-0,3519; 0,4507)
	Amígdala x Lavado	-0,2222	(-0,4076; -0,0369)
<i>M. catarrhalis</i>	Amígdala x Adenoide	0,4086	(-0,0008; 0,8180)
	Adenoide x Lavado	0,7179	(0,4334; 1,0000)
	Amígdala x Lavado	0,4211	(0,0989; 0,7432)

Houve concordância boa ou moderada entre os três materiais analisados (amígdala, adenoide e lavado nasofaríngeo) da detecção de *M. catarrhalis* (tabela 7). Comparando a detecção de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado nasofaríngeo, vimos que dos 10 pacientes que tinham a bactéria em algum desses dois materiais, 7 foram positivos simultaneamente em adenoide e lavado nasofaríngeo, enquanto 3 tinham *M. catarrhalis* somente no lavado, e nenhum tinha a bactéria somente na adenoide, mostrando assim concordância boa (anexo III - Tabela 95).

Na comparação entre amígdala e lavado para a detecção de *M. catarrhalis*, vimos que dos 10 pacientes que foram positivos para essa bactéria em amígdala ou lavado, em 4 a bactéria foi detectada simultaneamente nos dois materiais, contra 6 que tinham a bactéria somente no lavado, e nenhum só na amígdala, evidenciando concordância moderada (tabela 7).

Na comparação da presença de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide, vimos que dos 8 pacientes positivos na amígdala ou na adenoide, somente 3 tinham a bactéria simultaneamente nas duas tonsilas, enquanto 4 tinham *M. catarrhalis* somente na adenoide e 1 somente na amígdala, indicando uma concordância moderada (tabela 7) (anexo III - Tabela 75).

Quanto à análise de concordância entre os materiais para detecção de *S. aureus*, foi observada concordância boa entre amígdala e lavado nasofaríngeo, pois dos 5 pacientes com

S. aureus em um dos dois materiais, em 2 bactéria estava simultaneamente na amígdala e no lavado (tabela 7 e anexo III - Tabela 77).

As demais comparações entre materiais para detecção de *S. aureus* mostraram ausência de concordância.

Quanto a *S. pneumoniae* houve concordância moderada somente nas comparações entre amígdala e lavado, e adenoide e lavado, mas não entre as duas tonsilas (tabela 7).

Quanto a *H. influenzae* houve concordância moderada somente na comparação entre amígdala e lavado, com concordância ausente ou pobre nas demais comparações (tabela 7).

Não houve qualquer concordância nas comparações entre os diferentes materiais para a detecção de *P. aeruginosa* (tabela 7).

5. DISCUSSÃO

Na prática clínica diária, médicos generalistas, pediatras e otorrinolaringologistas se deparam com pacientes principalmente na faixa etária de 3 a 10 anos cujas mães referem que a criança apresenta roncos, apnéia e sono agitado. Muitas delas, além da respiração bucal crônica, apresentam ainda infecções de repetição que provocam ausências de atividades escolares, prejudicando o rendimento. O tratamento clínico dessas crianças frequentemente não é bem sucedido e muitas delas são encaminhadas à cirurgia para terem o seu problema resolvido. Nas últimas décadas, vários estudos têm investigado o papel de bactérias e de vírus na gênese de doença tonsilar crônica dessas crianças. No presente estudo, averiguamos a presença das principais bactérias do trato respiratório superior em crianças portadoras de doença tonsilar crônica submetidas a cirurgia, em comparação com crianças da mesma faixa etária sabidamente sem qualquer sintoma agudo ou crônico das vias respiratórias superiores.

Para isso, escolhemos um método sensível específico, a PCR em tempo real, para testar a presença de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O alvo de detecção foi o DNA dessas bactérias, o que torna o método específico e altamente sensível. A detecção por PCR não distingue entre bactérias viável e mortas, incluindo os restos bacterianos presentes no biofilme, mais é provavelmente mais fidedigno do que métodos de cultura como avaliação da flora bacteriana residente, pois a detecção independe do uso recente de antibióticos, agentes inflamatórios de uso tópico, e outros fatores que afetam a viabilidade de bactérias em cultivo axênico.

O presente estudo evidenciou que a frequência relativa das cinco bactérias testadas são bem diferentes entre si, tanto em pacientes, como em controles normais.

De um modo geral, independente do espécime testado, houve grande variedade de frequência de *H. influenzae* tanto nos controles como nos pacientes com doença tonsilar crônica em amígdala (57,1% e 64,8% respectivamente). Analisando a adenoide, observamos *S. pneumoniae* e *H. influenzae* foram as bactérias mais detectadas no grupo controle (64,2% em ambos), sendo a primeira frequente mais também nos pacientes com a doença (56,7%). Quanto ao lavado nasofaríngeo, *S. pneumoniae* apresentou alta frequência no grupo controle (78,5%), enquanto no grupo de pacientes com a doença tonsilar crônica, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* foram as mais detectadas (70,2% em ambas).

Quando observamos a detecção de bactérias nos lavados nasofaríngeos, vimos que as mais frequentemente detectadas nos pacientes com hipertrofia tonsilar foram *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, seguidas de *M. catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e a menos frequente foi *S. aureus*. Ordem de frequência semelhante foi observada nos controles, com detalhe interessante que *S. aureus* não foi detectado em nenhum lavado.

Semelhante ordenamento de frequência detecção das cinco bactérias estudadas foi observado também em tecido de adenoide amígdala, tanto em pacientes com hipertrofia tonsilar, quanto controles, com detalhe que *S. aureus* também não foi detectado em nenhum fragmento de amígdalas de controles.

A baixa frequência de *S. aureus* obtida no presente estudo contrasta com dados de Zautner *et al.* (2010) que estudaram 130 tonsilas de pacientes com amigdalites de repetição e em 124 abscessos, *Staphylococcus aureus* foi a espécie predominante (57,7%) em tonsilas e, como esperado, *Streptococcus pyogenes* foi a bactéria mais frequente (20,2%) em pacientes com abscesso peritonsilar. *S. aureus* foi localizado no interior de tonsila, e os resultados confirmaram que 87% dos *S. aureus* eram cepas invasivas. Os resultados indicaram que *S. aureus* intracelular é a causa mais comum de tonsilite recorrente e sugerem que *S. aureus* utiliza este local para sobreviver aos efeitos de antibióticos e à resposta imune do hospedeiro. É importante ressaltar que no mencionado estudo, os autores avaliaram somente pacientes com tonsilite recorrente e com abscessos peritonsilar, o que pode justificar, ao menos parcialmente, as diferenças entre os nossos resultados. Outrossim, o estudo foi feito na Alemanha, onde a porcentagem de portadores de *S. aureus* no trato respiratório superior pode ser diferente da encontrada em nosso meio.

H. influenzae foi encontrado em frequência elevadas no nosso estudo, inclusive estando presente em mais de 50% dos controles, chegando a 70% nos lavados nasofaríngeos. No estudo de Zautner *et al.* (2010), *H. influenzae* foi detectado com frequência de 23,1%, bem menos que a obtida por nós.

Na literatura encontramos alguns estudos utilizando técnicas menos sensíveis, como a cultura, para detecção de bactérias. Por exemplo, Brook e colaboradores (Brook *et al.*, 1980) estudaram espécimes do núcleo e da superfície de amígdalas de 23 crianças com amigdalite recorrente. Detectaram que em isolados aeróbios, as bactérias predominantes foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta-hemolítico, e *Haemophilus sp.* O mesmo pôde ser observado no estudo de Brook e Yocum (Brook e Yocum, 1984) em amígdalas de 22 adultos

jovens com amigdalite crônica. Isolados aeróbios mais frequentes foram *Staphylococcus aureus*, *Branhamella catarrhalis*, *Streptococcus* beta-hemolítico, e *Hemophilus sp.*

No estudo de Udovicki e colaboradores (Udovicki *et al.*, 1995), foram estudados 58 pacientes de faixa etária mais ampla que o presente estudo, 2 a 53 anos de idade, com quadro clínico de amigdalite crônica. *Staphylococcus aureus* foi detectada em 21 pacientes e em 25 pacientes no núcleo da amígdala. *Streptococcus pyogenes* grupo A e do grupo B tiveram frequências respectivamente de 5,17% e 1,72%. Os resultados desse estudo foram confirmados por Jeong e colaboradores (Jeong *et al.*, 2007) que analisaram os patógenos bacterianos em amigdalite recorrente e hipertrofia das amígdalas. Entre 824 casos, foram obtidas 966 cepas bacterianas coletadas a partir do núcleo de amígdalas. Na amigdalite recorrente, *Staphylococcus aureus* foi o patógeno mais comum (30,3%). Na hipertrofia tonsilar, *Haemophilus influenzae* foi o mais comum (15,5%), seguido de *S. pyogenes* (24,2%), *S. aureus* (22,9%), e *Streptococcus pneumoniae* (12,6%), independente de faixa etária. Os dados obtidos por casos de hipertrofia tonsilar assemelham-se aos nossos, a despeito de diferenças metodológicas.

Estudos de Rajeshwary (Rajeshwary *et al.*, 2013) que analisaram a microbiota de adenoide em adenoamigdalite crônica e hipertrofia de adenoide após adenoidectomia de 100 pacientes com idade de 3 a 12 anos, encontraram agentes patogênicos localizados principalmente no núcleo e os mais detectados foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus*. Apesar da semelhança de faixa etária dos pacientes e de terem mesma patologia, os dados são contrários aos obtidos no nosso estudo, que encontrou como bactérias mais detectadas *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, tanto em pacientes com hipertrofia tonsilar quanto nos controles. No entanto, devemos lembrar que no presente estudo foi analisado fragmento de tecido incluindo superfície e núcleo de tonsilas, enquanto no estudo de Rajeshwary somente amostras do núcleo foram analisadas. Além disso, nosso estudo usou detecção molecular e não cultura.

Brodsky e colaboradores (Brodsky *et al.*, 1988) analisaram 54 amostras do núcleo de tonsilas de 54 crianças submetidas à amigdalectomia por amigdalite crônica ou hipertrofia das amígdalas. Doze biópsias do núcleo da tonsila de 12 crianças sem histórico de doença serviram como controles. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Staphylococcus aureus* foram os microorganismos mais comumente encontrados em culturas de amígdalas doentes. *H. influenzae* foi detectado em 15 de 54

amígdalas (27%). Para *H. influenzae*, a quantidade de bactérias mostrou correlação positiva com o peso das amígdalas ($p < 0,05$). Quatorze das 15 (94%) amígdalas com *H. influenzae* foram provenientes de pacientes com hipertrofia tonsilar, enquanto apenas 6 de 10 pacientes (60%) com *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* tinham hipertrofia de amígdalas. Estes achados concordam com os obtidos no presente estudo.

Estudos feitos por Surow e colaboradores (Surow *et al.*, 1989) detectaram alta incidência de *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus* em amígdalas de 97 crianças submetidas à amigdalectomia. Nesse estudo, as amostras foram divididas em dois grupos para verificar concordância entre a cultura de swab da superfície e núcleo das amígdalas. Em muitos casos, organismos patogênicos estavam no núcleo das amígdalas, enquanto a superfície continha apenas a microbiota respiratória.

Outro estudo foi realizado com 4 grupos amostrais contendo 15 crianças cada, com otite média recorrente, adenoamigdalite recorrente, hipertrofia de adenóide obstrutiva e comparando pacientes com controles (oclusão ou anormalidades da fala), (Brook *et al.*, 2000). Culturas de adenoides removidas cirurgicamente de pacientes, assim como de controles saudáveis foram submetidas a cultura bacteriana. Os aeróbios predominantes foram *Streptococcus* alfa-hemolítica e gama-hemolítica, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta-hemolíticos e *Moraxella catarrhalis*. Os anaeróbios predominantes foram *Peptostreptococcus*, *Prevotella* e *Fusobacterium*. A quantidade, e a distribuição de organismos não variou entre os três grupos de adenoides doentes. No entanto, as quantidades daqueles microorganismos mais patogênicos e que produziram β -lactamase foi menor nos controles que nas adenoides doentes ($P < 0,001$). Brook utilizou amostras de pacientes e controles, e observou *S. pneumoniae* como patógeno mais frequente, sendo esta bactéria também frequentemente detectada em nosso estudo. No nosso estudo porém, avaliamos ambas as tonsilas e o lavado, enquanto Brook analisou apenas adenoide.

Embora usando espécimes diferentes dos utilizados em nosso estudo, Van Staaij e colaboradores (Van Staaij *et al.*, 2003) fizeram um estudo semelhante, no qual utilizaram swabs da superfície de amígdalas de 218 crianças submetidas a adenoamigdalectomia por amigdalite recorrente ou hipertrofia adenoamigdaliana, bem como controles consistindo de 100 crianças sem sintomas da doença tonsilar. *Haemophilus influenzae* foi o patógeno mais comum em ambos os grupos, sendo encontrado em 41% dos pacientes e 34% do grupo controle. *H. influenzae* foi encontrado em 32% das crianças com amigdalites recorrentes, em

comparação com 48% das crianças com sintomas de hipertrofia das amígdalas ($p = 0,03$). Apenar do estudo de Van Staaij ter usado como amostra *Swab* de amígdalas, a alta frequência de *H. influenzae* esta de acordo com nosso estudo.

Em nosso estudo, além da alta frequência de detecção de *H. influenzae* em amígdala, observamos também alta frequência em adenoide, tanto de pacientes controles quanto com hipertrofia tonsilar. Taylan e colaboradores (Taylan *et al.*, 2011) investigaram por cultivo a microbiota não apenas das amígdalas, mas também do núcleo e da superfície de adenoides. Os outros estudaram 91 crianças submetidas a amigdalectomia e adenoidectomia. Os mais frequentes microrganismos aeróbios isolados foram *Streptococcus viridans* e *Neisseria sp.* Foi realizada, a análise de detecção bacteriana na superfície das amígdalas em comparação com o núcleo, não encontrando resultado significativo ($P=0,05$), mas houve alta taxa de detecção de bactérias aeróbicas em tecidos adenoideano. O nosso estudo não objetivou a detecção de *Streptococcus viridans* nem de *Neisseria sp.*, mas a falta de detecção das bactéria *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* no estudo Taylan et al contrasta fortemente com nossos resultados.

O nosso resultado de alta frequência de *H. influenzae* foi confirmado por Gaffney (Gaffney *et al.*, 1991), que estudou a microbiota tonsilar de 262 pacientes com amigdalite recorrente.

Em uma revisão feita por Lindroos (Lindroos, 2000) foram mostradas análises do núcleo de amígdalas de pacientes com amigdalite recorrente. As bactérias mais encontradas foram *Haemophilus influenzae*, seguido por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Esses dados assemelham-se aos de Jeong e colaboradores (Jeong *et al.*, 2007), que em hipertrofia tonsilar obtiveram *H. influenzae* como o isolado mais frequente (31,4%), seguido de *S. pyogenes* (24,2%), *S. aureus* (22,9%), e *Streptococcus pneumoniae* (12,6%).

A supremacia de frequência de *H. influenzae* foi também verificada por Trafny e colaboradores (Trafny *et al.*, 2014). Em um estudo de 41 crianças com hipertrofia crônica de adenoide.

Contrariamente, Alasil *et al.* (2013) e colaboradores relataram supremacia de frequência de *S. aureus* por cultura, em doença tonsilar crônica; e Almadori *et al.* (1988) relatou predominância de *Neisseria* e *S. aureus*. Além desses estudos Torreta (Torretta *et al.*, 2013) também relatou *S. aureus* como bactéria mais frequentemente detectada em biópsias de

tonsilas, e verificou significativamente associação entre hipertrofia tonsilar e presença de bactérias produtoras de biofilme.

Quanto às frequências de bactérias detectadas, ressaltamos no nosso estudo a alta frequência de *H. influenzae* em todos os espécimes estudados, e de *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* principalmente em adenoide e lavados nasofaríngeos. Ressaltamos também a baixa frequência de *S. aureus*, agente que tem frequentemente sido relatado como de alta prevalência em estudos anteriores, como alguns mencionados acima.

Dos estudos acima mencionados, fica claro que há variações dependentes dos métodos utilizados, bem como do espécime e da região de onde as amostras são colhidas, variando com superfície versus núcleo das tonsilas, bem como a adenoide versus amígdala. No presente estudo tivemos não só os tecidos tonsilares (incluindo superfície e núcleo), mas também lavados nasofaríngeos. Isso nos permitiu verificar a concordância nas detecções de diferentes bactérias entre diferentes espécimes. Nesse aspecto, algumas observações feitas chamaram a atenção.

Os pacientes do grupo controle, sem sintomas respiratórios e sem hipertrofia tonsilar, refletem a microbiota da população nessa faixa etária. Nesse grupo, chamou a atenção a concordância boa entre amígdala e adenoide quanto à detecção de *H. influenzae* (coeficiente kappa=0,6829). Houve também concordância moderada entre amígdala e adenoide quanto à detecção de *M. catarrhalis* (coeficiente kappa=0,4324). Em contrapartida, houve falta de concordância entre tonsilas palatinas e faríngeas quanto à detecção de *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. No nosso estudo, no grupo controle *S. pneumoniae* foi bem mais frequente em adenoides do que em amígdalas, enquanto *P. aeruginosa* foi mais frequente em amígdalas do que em adenoides.

É muito interessante verificar que não há homogeneidade de flora entre amígdala e adenoide para todas as bactérias testadas, sugerindo que o estabelecimento de microbiota entre nesses dois tecidos depende de fatores específicos de cada tonsila, e não somente da exposição da sua superfície a secreções contendo os microorganismos em estado planquitônico.

Considerando o grupo de pacientes com hipertrofia tonsilar, não houve concordância digna de nota entre amígdala e adenoide para nenhuma das bactérias estudadas. É possível que na presença de hipertrofia tonsilar, alterações morfo-funcionais das tonsilas em estado

hipertrófico reduzam as diferenças entre esses dois sítios quanto ao estabelecimento de microbiota.

Curiosamente, porém quando foram analisados somente os pacientes mais hipertróficos, apareceu com mais força a concordância entre diferentes espécimes de adenoide, amígdala e lavado, quanto à detecção de *M. catarrhalis*. É possível que a detecção de *M. catarrhalis*, conquanto não seja essa bactéria o agente causal da hipertrofia, seja favorecida na presença de maiores graus de hipertrofia tonsilar, por razões desconhecidas.

Desconhecemos estudos prévios que tenham feito essas comparações de concordância entre amígdala, adenoide e lavado nasofaríngeo.

O presente estudo mostrou que há elevadas frequências de detecção de bactérias da microbiota em tecidos de amígdalas e adenoides, bem como em lavados nasofaríngeo. A discordância frequente entre diferentes espécimes quanto a detecção de bactérias mostra que há diferenças importantes nos fatores que controlam a colonização desses sítios do trato respiratório superior.

6. CONCLUSÕES

1. As bactérias *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* têm frequências elevadas de detecção (>20%) em tonsilas e lavados nasofaríngeo de crianças normais, sendo sem hipertrofia tonsilar e sem sintomas de infecção respiratório;
2. Não há maiores frequências de detecção de bactérias comuns da microbiota em pacientes com hipertrofia tonsilr do que em controles;
3. Diferentemente das demais bactérias, há concordância moderada ou boa nas detecções de *M. catarrhalis* e *H. influenzae* entre adenoide e amígdada de indivíduos sem sintomas respiratórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELDAIM, G. M. et al. Detection of Haemophilus influenzae in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 4, p. 366-73, Aug 2009.

ALASIL, S. M. et al. Evidence of Bacterial Biofilms among Infected and Hypertrophied Tonsils in Correlation with the Microbiology, Histopathology, and Clinical Symptoms of Tonsillar Diseases. **Int J Otolaryngol**, v. 2013, p. 408238, 2013.

ALMADORI, G. et al. Microbial flora of surface versus core tonsillar cultures in recurrent tonsillitis in children. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 15, n. 2, p. 157-62, May 1988.

BALDA, M. S.; MATTER, K. Tight junctions and the regulation of gene expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 4, p. 761-7, Apr 2009.

BERGLER, W. et al. Age-dependent altered proportions in subpopulations of tonsillar lymphocytes. **Clin Exp Immunol**, v. 116, n. 1, p. 9-18, Apr 1999.

BRANDTZAEG, P. The B-cell development in tonsillar lymphoid follicles. **Acta Otolaryngol Suppl**, v. 523, p. 55-9, 1996.

_____. Regionalized immune function of tonsils and adenoids. **Immunol Today**, v. 20, n. 8, p. 383-4, Aug 1999.

_____. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 67 Suppl 1, p. S69-76, Dec 2003.

BRANDTZAEG, P.; HALSTENSEN, T. S. Immunology and immunopathology of tonsils. **Adv Otorhinolaryngol**, v. 47, p. 64-75, 1992.

BRODSKY, L.; MOORE, L.; STANIEVICH, J. The role of Haemophilus influenzae in the pathogenesis of tonsillar hypertrophy in children. **Laryngoscope**, v. 98, n. 10, p. 1055-60, Oct 1988.

BROOK, I.; SHAH, K.; JACKSON, W. Microbiology of healthy and diseased adenoids. **Laryngoscope**, v. 110, n. 6, p. 994-9, Jun 2000.

BROOK, I.; YOCUM, P. Bacteriology of chronic tonsillitis in young adults. **Arch Otolaryngol**, v. 110, n. 12, p. 803-5, Dec 1984.

BROOK, I.; YOCUM, P.; SHAH, K. Surface vs core-tonsillar aerobic and anaerobic flora in recurrent tonsillitis. **JAMA**, v. 244, n. 15, p. 1696-8, Oct 10 1980.

CASAMAYOR-PALLEJA, M. et al. Expression of macrophage inflammatory protein-3alpha, stromal cell-derived factor-1, and B-cell-attracting chemokine-1 identifies the tonsil crypt as an attractive site for B cells. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3992-4, Jun 15 2001.

CORLESS, C. E. et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 1553-8, Apr 2001.

CROWE, C. C.; SANDERS, W. E., JR.; LONGLEY, S. Bacterial interference. II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization by group A *Streptococcus*. **J Infect Dis**, v. 128, n. 4, p. 527-32, Oct 1973.

DEMIR, U. L. et al. The impacts of adenotonsillar hypertrophy on periodontal health in children: a prospective controlled pilot study. **Am J Otolaryngol**, v. 34, n. 5, p. 501-4, Sep-Oct 2013.

ENDO, L. H. et al. Detection of Epstein-Barr virus and subsets of lymphoid cells in adenoid tissue of children under 2 years of age. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 66, n. 3, p. 223-6, Dec 2 2002.

ERDAG, T. K. et al. Pathologic evaluation of routine tonsillectomy and adenoidectomy specimens in the pediatric population: is it really necessary? **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 69, n. 10, p. 1321-5, Oct 2005.

FADEN, H. et al. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. **J Infect Dis**, v. 175, n. 6, p. 1440-5, Jun 1997.

FADEN, H. et al. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. **J Infect Dis**, v. 172, n. 1, p. 132-5, Jul 1995.

FEIZABADI, M. M. et al. Direct detection of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with healthcare associated pneumonia by real time PCR. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 8, p. 1247-51, Dec 2010.

GAFFNEY, R. J. et al. Differences in tonsil core bacteriology in adults and children: a prospective study of 262 patients. **Respir Med**, v. 85, n. 5, p. 383-8, Sep 1991.

GARCIA-RODRIGUEZ, J. A.; FRESNADILLO MARTINEZ, M. J. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. **J Antimicrob Chemother**, v. 50 Suppl S2, p. 59-73, Dec 2002.

GEBERT, A. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. **Histochem Cell Biol**, v. 108, n. 6, p. 455-70, Dec 1997.

GHAFFAR, F.; FRIEDLAND, I. R.; MCCracken, G. H., JR. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Pediatr Infect Dis J**, v. 18, n. 7, p. 638-46, Jul 1999.

- GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 244-53, Apr 2011.
- GUMBINER, B. M. Breaking through the tight junction barrier. **J Cell Biol**, v. 123, n. 6 Pt 2, p. 1631-3, Dec 1993.
- HEINIGER, N. et al. A reservoir of *Moraxella catarrhalis* in human pharyngeal lymphoid tissue. **J Infect Dis**, v. 196, n. 7, p. 1080-7, Oct 1 2007.
- HELLINGS, P.; JORISSEN, M.; CEUPPENS, J. L. The Waldeyer's ring. **Acta Otorhinolaryngol Belg**, v. 54, n. 3, p. 237-41, 2000.
- JABBARI MOGHADDAM, Y.; RAFEEY, M.; RADFAR, R. Comparative assessment of *Helicobacter pylori* colonization in children tonsillar tissues. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 9, p. 1199-201, Sep 2009.
- JEONG, J. H. et al. Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. **Laryngoscope**, v. 117, n. 12, p. 2146-51, Dec 2007.
- KILIC, A. et al. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 66, n. 4, p. 349-55, Apr 2010.
- KUPER, C. F. et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. **Immunol Today**, v. 13, n. 6, p. 219-24, Jun 1992.
- KURNATOWSKI, P. et al. Physical and emotional disturbances in children with adenotonsillar hypertrophy. **J Laryngol Otol**, v. 122, n. 9, p. 931-5, Sep 2008.
- LINDROOS, R. Bacteriology of the tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hyperplasia--a short review. **Acta Otolaryngol Suppl**, v. 543, p. 206-8, 2000.
- LOPEZ-GONZALEZ, M. A. et al. Lack of lymphoid cell apoptosis in the pathogenesis of tonsillar hypertrophy as compared to recurrent tonsillitis. **Eur J Pediatr**, v. 158, n. 6, p. 469-73, Jun 1999.
- MARGOLIS, E.; YATES, A.; LEVIN, B. R. The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 59, 2010.
- MATTILA, P. S.; TARKKANEN, J. Differentiation of T lymphocytes in the human adenoid as measured by the expression of CD45 isoforms. **Scand J Immunol**, v. 48, n. 1, p. 59-64, Jul 1998.
- MITCHELL, R. B.; KELLY, J. Quality of life after adenotonsillectomy for SDB in children. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 133, n. 4, p. 569-72, Oct 2005.

NAVE, H.; GEBERT, A.; PABST, R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. **Anat Embryol (Berl)**, v. 204, n. 5, p. 367-73, Nov 2001.

OGASAWARA, N. et al. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. **Acta Otolaryngol**, v. 131, n. 2, p. 116-23, Feb 2011.

PAMER, E. G. Immune responses to commensal and environmental microbes. **Nat Immunol**, v. 8, n. 11, p. 1173-8, Nov 2007.

PETTIGREW, M. M. et al. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3750-5, Nov 2011.

QUIDING-JARBRINK, M. et al. Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. **Infect Immun**, v. 63, n. 3, p. 853-7, Mar 1995.

QUIDING, M. et al. Induction of specific antibody responses in the human nasopharyngeal mucosa. **Adv Exp Med Biol**, v. 371B, p. 1445-50, 1995.

RAJESHWARY, A. et al. Bacteriology of symptomatic adenoids in children. **N Am J Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 113-8, Feb 2013.

ROTIMI, V. O.; DUERDEN, B. I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **J Med Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 51-62, Feb 1981.

SCADDING, G. K. Immunology of the tonsil: a review. **J R Soc Med**, v. 83, n. 2, p. 104-7, Feb 1990.

SCHLEIMER, R. P. et al. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, n. 6, p. 1279-84, Dec 2007.

SCHRIEVER, F. et al. Human T lymphocytes bind to germinal centers of human tonsils via integrin $\alpha 4$ /VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 and -2. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 1, p. 35-9, Jan 1997.

SCLAFANI, A. P. et al. Treatment of symptomatic chronic adenotonsillar hypertrophy with amoxicillin/clavulanate potassium: short- and long-term results. **Pediatrics**, v. 101, n. 4 Pt 1, p. 675-81, Apr 1998.

SMITH, K.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Semin Immunol**, v. 19, n. 2, p. 59-69, Apr 2007.

SURJAN, L., JR. Tonsils and lympho-epithelial structures in the pharynx as immuno-barriers. **Acta Otolaryngol**, v. 103, n. 5-6, p. 369-72, May-Jun 1987.

SUROW, J. B. et al. Bacteriology of tonsil surface and core in children. **Laryngoscope**, v. 99, n. 3, p. 261-6, Mar 1989.

TAN, T. T. et al. Haemophilus influenzae survival during complement-mediated attacks is promoted by Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles. **J Infect Dis**, v. 195, n. 11, p. 1661-70, Jun 1 2007.

TAYLAN, I. et al. Comparison of the surface and core bacteria in tonsillar and adenoid tissue with Beta-lactamase production. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 63, n. 3, p. 223-8, Jul 2011.

TORRETTA, S. et al. Recurrences in chronic tonsillitis sustained by tonsillar biofilm-producing bacteria in children. Relationship with the grade of tonsillar hyperplasy. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 77, n. 2, p. 200-4, Feb 2013.

TRAFNY, E. A. et al. Carriage of antibiotic-resistant Haemophilus influenzae strains in children undergoing adenotonsillectomy. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 5-6, p. 554-64, Jul 2014.

UDOVICKI, J.; RADIC, S.; MILANKOV, O. [Bacterial study in patients with chronic disease of the palatine tonsils]. **Med Pregl**, v. 48, n. 3-4, p. 103-7, 1995.

VAN KEMPEN, M. J.; RIJKERS, G. T.; VAN CAUWENBERGE, P. B. The immune response in adenoids and tonsils. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 122, n. 1, p. 8-19, May 2000.

VAN STAAL, B. K. et al. Does the tonsillar surface flora differ in children with and without tonsillar disease? **Acta Otolaryngol**, v. 123, n. 7, p. 873-8, Sep 2003.

VERMA, S. P. et al. Histologic analysis of pediatric tonsil and adenoid specimens: is it really necessary? **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 4, p. 547-50, Apr 2009.

WEI, J. L. et al. Improved behavior and sleep after adenotonsillectomy in children with sleep-disordered breathing: long-term follow-up. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 135, n. 7, p. 642-6, Jul 2009.

YING, M. D. Immunological basis of indications for tonsillectomy and adenoidectomy. **Acta Otolaryngol Suppl**, v. 454, p. 279-85, 1988.

ZALACAIN, R. et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, v. 13, n. 2, p. 343-8, Feb 1999.

ZAUTNER, A. E. et al. Intracellular persisting Staphylococcus aureus is the major pathogen in recurrent tonsillitis. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9452, 2010.

8. ANEXOS

ANEXO I

Tabela 8. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre amígdala e adenoide				
<i>S. aureus</i> amígdala		<i>S. aureus</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		32	1	33
		91.43	100.00	
1		3	0	3
		8.57	0.00	
Total		35	1	36
Frequência perdida = 1				

Tabela 9. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.0435
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1098
95% Intervalo de confiança máximo	0.0228

Tabela 10. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre amígdala e adenoide				
<i>S. pneumoniae</i> amígdala		<i>S. pneumoniae</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		9	9	18
		56.25	42.86	
1		7	12	19
		43.75	57.14	
Total		16	21	37

Tabela 11. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.1320
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1858
95% Intervalo de confiança máximo	0.4497

Tabela 12. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre amígdala e adenoide				
<i>H. influenzae</i> amígdala		<i>H. influenzae</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		10	3	13
		47.62	18.75	
1		11	13	24
		52.38	81.25	
Total		21	16	37

Tabela 13. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.2725
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.0046
95% Intervalo de confiança máximo	0.5495

Tabela 14. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre amígdala e adenoide				
<i>P. aeruginosa</i> amígdala		<i>P. aeruginosa</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		26	5	31
		89.66	62.50	
1		3	3	6
		10.34	37.50	
Total		29	8	37

Tabela 15. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.2986
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.0725
95% Intervalo de confiança máximo	0.6696

Tabela 16. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre amígdala e adenoide				
<i>M. catarrhalis</i> amígdala		<i>M. catarrhalis</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		21	10	31
		95.45	66.67	
1		1	5	6
		4.55	33.33	
Total		22	15	37

Tabela 17. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.3183
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0437
95% Intervalo de confiança máximo	0.5928

Tabela 18. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre amígdala e lavado				
<i>S. aureus</i> amígdala		<i>S. aureus</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		32	2	34
		96.97	50.00	
1		1	2	3
		3.03	50.00	
Total		33	4	37

Tabela 19. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.5277
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0599
95% Intervalo de confiança máximo	0.9954

Tabela 20. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre amígdala e lavado				
<i>S. pneumoniae</i> amígdala		<i>S. pneumoniae</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		9	8	17
		90.00	30.77	
1		1	18	19
		10.00	69.23	
Total		10	26	36
Frequência perdida = 1				

Tabela 21. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.4873
95% Intervalo de confiança mínimo	0.2219
95% Intervalo de confiança máximo	0.7528

Tabela 22. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre amígdala e lavado				
<i>H. influenzae</i> amígdala		<i>H. influenzae</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		7	6	13
		63.64	23.08	
1		4	20	24
		36.36	76.92	
Total		11	26	37

Tabela 23. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.3854
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0724
95% Intervalo de confiança máximo	0.6984

Tabela 24. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre amígdala e lavado				
<i>P. aeruginosa</i> amígdala		<i>P. aeruginosa</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		23 82.14	8 88.89	31
1		5 17.86	1 11.11	6
Total		28	9	37

Tabela 25. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre amígdalae lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.0761
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3555
95% Intervalo de confiança máximo	0.2034

Tabela 26. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre amígdala e lavado				
<i>M. catarrhalis</i> amígdala		<i>M. catarrhalis</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		17 100.00	14 70.00	31
1		0 0.00	6 30.00	6
Total		17	20	37

Tabela 27. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre amígdala e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.2825
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0761
95% Intervalo de confiança máximo	0.4890

Tabela 28. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre adenoide e lavado				
<i>S. aureus</i> adenoide		<i>S. aureus</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		31	4	35
		96.88	100.00	
1		1	0	1
		3.13	0.00	
Total		32	4	36
Frequência perdida = 1				

Tabela 29. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.0465
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1218
95% Intervalo de confiança máximo	0.0287

Tabela 30. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre adenoide e lavado				
<i>S. pneumoniae</i> adenoide		<i>S. pneumoniae</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		9	7	16
		90.00	26.92	
1		1	19	20
		10.00	73.08	
Total		10	26	36
Frequency Missing = 1				

Tabela 31. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.5325
95% Intervalo de confiança mínimo	0.2658
95% Intervalo de confiança máximo	0.7991

Tabela 32. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre adenoide e lavado				
<i>H. influenzae</i> adenoide		<i>H. influenzae</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		9	12	21
		81.82	46.15	
1		2	14	16
		18.18	53.85	
Total		11	26	37

Tabela 33. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.2825
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0243
95% Intervalo de confiança máximo	0.5408

Tabela 34. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre adenoide e lavado				
<i>P. aeruginosa</i> adenoide		<i>P. aeruginosa</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		22	7	29
		78.57	77.78	
1		6	2	8
		21.43	22.22	
Total		28	9	37

Tabela 35. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.0082
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3152
95% Intervalo de confiança máximo	0.3317

Tabela 36. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre adenoide e lavado				
<i>M. catarrhalis</i> adenoide		<i>M. catarrhalis</i> lavado		
Frequência		0	1	Total
0		16	6	22
		94.12	30.00	
1		1	14	15
		5.88	70.00	
Total		17	20	37

Tabela 37. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado em pacientes com doença tonsilar crônica.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.6273
95% Intervalo de confiança mínimo	0.3876
95% Intervalo de confiança máximo	0.8671

ANEXO II

Tabela 38. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre amígdala e adenoide			
<i>S. aureus</i> amígdala		<i>S. aureus</i> adenoide	
Frequência	0	1	Total
0	12	2	14
	100.00	100.00	
1	0	0	0
	0.00	0.00	
Total	12	2	14

Tabela 39. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.0000
95% Intervalo de confiança mínimo	-1.04
95% Intervalo de confiança máximo	1.04

Tabela 40. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre amígdala e adenoide				
<i>S. pneumoniae</i> amígdala		<i>S. pneumoniae</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		3 60.00	7 77.78	10
1		2 40.00	2 22.22	4
Total		5	9	14

Tabela 41. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.1455
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.5712
95% Intervalo de confiança máximo	0.2802

Tabela 42. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre amígdala e adenoide				
<i>H. influenzae</i> amígdala		<i>H. influenzae</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		4 100.00	2 22.22	6
1		0 0.00	7 77.78	7
Total		4	9	13
Frequência perdida = 1				

Tabela 43. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.6829
95% Intervalo de confiança mínimo	0.2996
95% Intervalo de confiança máximo	1.0000

Tabela 44. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre amígdala e adenoide				
<i>P. aeruginosa</i> amígdala		<i>P. aeruginosa</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		8	2	10
		66.67	100.00	
1		4	0	4
		33.33	0.00	
Total		12	2	14

Tabela 45. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.2353
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.4760
95% Intervalo de confiança máximo	0.0054

Tabela 46. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre amígdala e adenoide				
<i>M. catarrhalis</i> amígdala		<i>M. catarrhalis</i> adenoide		Total
Frequência		0	1	
0		9	2	11
		90.00	50.00	
1		1	2	3
		10.00	50.00	
Total		10	4	14

Tabela 47. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.4324
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1001
95% Intervalo de confiança máximo	0.9649

Tabela 48. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre amígdala e lavado				
<i>S. aureus</i> amígdala		<i>S. aureus</i> lavado		Total
Frequência				
	0	0	1	
	0	14	0	14
		100.00		
	1	0	0	0
Total		14		14

Tabela 49. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre amígdala e lavado				
<i>S. pneumoniae</i> amígdala		<i>S. pneumoniae</i> lavado		Total
Frequência				
	0	0	1	
	0	3	7	10
		100.00	63.64	
	1	0	4	4
		0.00	36.36	
Total		3	11	14

Tabela 50. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre amígdalae lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.1967
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.0539
95% Intervalo de confiança máximo	0.4473

Tabela 51. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre amígdala e lavado				
H. influenza amígdala		H. influenza lavado		Total
Frequência		0	1	
0		2	4	6
		50.00	40.00	
1		2	6	8
		50.00	60.00	
Total		4	10	14

Tabela 52. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.0870
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.4156
95% Intervalo de confiança máximo	0.5895

Tabela 53. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre amígdala e lavado				
<i>P. aeruginosa</i> amígdala		<i>P. aeruginosa</i> lavado		Total
Frequência		0	1	
0		9	1	10
		75.00	50.00	
1		3	1	4
		25.00	50.00	
Total		12	2	14

Tabela 54. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.1765
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3573
95% Intervalo de confiança máximo	0.7103

Tabela 55. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>M. c atarrhalis</i> entre amígdala e lavado				
<i>M. catarrhalis</i> amígdala		<i>M. catarrhalis</i> lavado		
Frequência		0	1	Total
0		7	4	11
		100.00	57.14	
1		0	3	3
		0.00	42.86	
Total		7	7	14

Tabela 56. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre amígdala e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.4286
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0402
95% Intervalo de confiança máximo	0.8170

Tabela 57. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre adenoide e lavado				
<i>S. aureus</i> adenoide		<i>S. aureus</i> lavado		
Frequência		0	1	Total
0		12(85.71)	0	12
1		2(14.29)	0	2
Total		14		14

Tabela 58. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.000
95% Intervalo de confiança mínimo	-1.04
95% Intervalo de confiança máximo	1.04

Tabela 59. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre adenoide e lavado			
<i>S. pneumoniae</i> adenoide	<i>S. pneumoniae</i> lavado		
Frequência	0	1	Total
0	2 66.67	3 27.27	5
1	1 33.33	8 72.73	9
Total	3	11	14

Tabela 60. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.3171
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1899
95% Intervalo de confiança máximo	0.8241

Tabela 61. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre adenoide e lavado			
<i>H. influenzae</i> adenoide	<i>H. influenzae</i> lavado		
Frequência	0	1	Total
0	2 66.67	2 20.00	4
1	1 33.33	8 80.00	9
Total	3	10	13
Frequency Missing = 1			

Tabela 62. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.4179
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1244
95% Intervalo de confiança máximo	0.9602

Tabela 63. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre adenoide e lavado			
<i>P. aeruginosa</i> adenoide		<i>P. aeruginosa</i> lavado	
Frequência		0	1
0	10	2	12
	83.33	100.00	
1	2	0	2
	16.67	0.00	
Total	12	2	14

Tabela 64. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.1667
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3277
95% Intervalo de confiança máximo	-0.0056

Tabela 65. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre adenoide e lavado			
<i>M. catarrhalis</i> adenoide		<i>M. catarrhalis</i> lavado	
Frequência		0	1
0	7	3	10
	100.00	42.86	
1	0	4	4
	0.00	57.14	
Total	7	7	14

Tabela 66. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado em pacientes do grupo controle.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.5714
95% Intervalo de confiança mínimo	0.1830
95% Intervalo de confiança máximo	0.9598

ANEXO III

Tabela 67. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre amígdala e adenoide			
<i>S. aureus</i> amígdala	<i>S. aureus</i> adenoide		
Frequência	0	1	Total
0	17 85.00	1 100.00	18
1	3 15.00	0 0.00	3
Total	20	1	21
Frequência perdida= 1			

Tabela 68. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.0769
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1958
95% Intervalo de confiança máximo	0.0419

Tabela 69. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre amígdala e adenoide			
<i>S. pneumoniae</i> amígdala	<i>S. pneumoniae</i> adenoide		
Frequência	0	1	Total
0	5 50.00	5 41.67	10
1	5 50.00	7 58.33	12
Total	10	12	22

Tabela 70. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.0833
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3336
95% Intervalo de confiança máximo	0.5003

Tabela 71. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre amígdala e adenoide			
<i>H. influenzae</i> amígdala		<i>H. influenzae</i> adenoide	
Frequência	0	1	Total
0	8	1	9
	57.14	12.50	
1	6	7	13
	42.86	87.50	
Total	14	8	22

Tabela 72. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre amígdalae adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.3937
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0567
95% Intervalo de confiança máximo	0.7307

Tabela 73. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre amígdala e adenoide				
<i>P. aeruginosa</i> amígdala		<i>P. aeruginosa</i> adenoide		
Frequência		0	1	Total
0		17	2	19
		89.47	66.67	
1		2	1	3
		10.53	33.33	
Total		19	3	22

Tabela 74. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.2281
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3084
95% Intervalo de confiança máximo	0.7646

Tabela 75. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre amígdala e adenoide				
<i>M. catarrhalis</i> amígdala		<i>M. catarrhalis</i> adenoide		
Frequência		0	1	Total
0		14	4	18
		93.33	57.14	
1		1	3	4
		6.67	42.86	
Total		15	7	22

Tabela 76. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre amígdala e adenoide em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.4086
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.0008
95% Intervalo de confiança máximo	0.8180

Tabela 77. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre amígdala e lavado			
<i>S. aureus</i> amígdala		<i>S. aureus</i> lavado	
Frequência	0	1	Total
0	18	1	19
	94.74	33.33	
1	1	2	3
	5.26	66.67	
Total	19	3	22

Tabela 78. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.6140
95% Intervalo de confiança mínimo	0.1266
95% Intervalo de confiança máximo	1.0000

Tabela 79. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre amígdala e lavado			
<i>S. pneumoniae</i> amígdala	<i>S. pneumoniae</i> lavado		
Frequência	0	1	Total
0	6 85.71	4 26.67	10
1	1 14.29	11 73.33	12
Total	7	15	22

Tabela 80. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.5299
95% Intervalo de confiança mínimo	0.1836
95% Intervalo de confiança máximo	0.8763

Tabela 81. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre amígdala e lavado			
<i>H. influenzae</i> amígdala	<i>H. influenzae</i> lavado		
Frequência	0	1	Total
0	6 75.00	3 21.43	9
1	2 25.00	11 78.57	13
Total	8	14	22

Tabela 82. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.5217
95% Intervalo de confiança mínimo	0.1575
95% Intervalo de confiança máximo	0.8859

Tabela 83. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre amígdala e lavado			
<i>P. aeruginosa</i> amígdala		<i>P. aeruginosa</i> lavado	
Frequência		0	1
0		13 81.25	6 100.00
1		3 18.75	0 0.00
Total		16	6
			22

Tabela 84. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.2222
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.4076
95% Intervalo de confiança máximo	-0.0369

Tabela 85. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre amígdala e lavado			
<i>M. catarrhalis</i> amígdala		<i>M. catarrhalis</i> lavado	
Frequência		0	1
0		12 100.00	6 60.00
1		0 0.00	4 40.00
Total		12	10
			22

Tabela 86. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre amígdala e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.4211
95% Intervalo de confiança mínimo	0.0989
95% Intervalo de confiança máximo	0.7432

Tabela 87. Estatística de concordância de detecção de *S. aureus* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>S. aureus</i> entre adenoide e lavado			
<i>S.aureus</i> adenoide	<i>S. aureus</i> lavado		
Frequência	0	1	Total
0	17 94.44	3 100.00	20
1	1 5.56	0 0.00	1
Total	18	3	21
Frequência perdida = 1			

Tabela 88. Valor do coeficiente Kappa de *S. aureus* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	-0.0769
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1958
95% Intervalo de confiança máximo	0.0419

Tabela 89. Estatística de concordância de detecção de *S. pneumoniae* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>S. pneumoniae</i> entre adenoide e lavado			
<i>S. pneumoniae</i> adenoide	<i>S. pneumoniae</i> lavado		
Frequência	0	1	Total
0	6 85.71	4 26.67	10
1	1 14.29	11 73.33	12
Total	7	15	22

Tabela 90. Valor do coeficiente Kappa de *S. pneumoniae* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.5299
95% Intervalo de confiança mínimo	0.1836
95% Intervalo de confiança máximo	0.8763

Tabela 91. Estatística de concordância de detecção de *H. influenzae* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>H. influenzae</i> entre adenoide e lavado				
<i>H. influenzae</i> adenoide		<i>H. influenzae</i> lavado		
Frequência		0	1	Total
0		6	8	14
		75.00	57.14	
1		2	6	8
		25.00	42.86	
Total		8	14	22

Tabela 92. Valor do coeficiente Kappa de *H. influenzae* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.1538
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.1936
95% Intervalo de confiança máximo	0.5013

Tabela 93. Estatística de concordância de detecção de *P. aeruginosa* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>P. aeruginosa</i> entre adenoide e lavado				
<i>P. aeruginosa</i> adenoide		<i>P. aeruginosa</i> lavado		
Frequência		0	1	Total
0		14	5	19
		87.50	83.33	
1		2	1	3
		12.50	16.67	
Total		16	6	22

Tabela 94. Valor do coeficiente Kappa de *P. aeruginosa* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.0494
95% Intervalo de confiança mínimo	-0.3519
95% Intervalo de confiança máximo	0.4507

Tabela 95. Estatística de concordância de detecção de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Tabela de <i>M. catarrhalis</i> entre adenoide e lavado			
M. catarrhalis adenoide		<i>M. catarrhalis</i> lavado	
Frequency			
Col Pct	0	1	Total
0	12 100.00	3 30.00	15
1	0 0.00	7 70.00	7
Total	12	10	22

Tabela 96. Valor do coeficiente Kappa de *M. catarrhalis* entre adenoide e lavado em pacientes com grau máximo de hipertrofia.

Coeficiente kappa	
Kappa	0.7179
95% Intervalo de confiança mínimo	0.4334
95% Intervalo de confiança máximo	1.0000