Eliane Rodrigues Tsukimoto

Avaliação de novos métodos para a cultura de anaeróbios

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Rossi

São Paulo

2018

Eliane Rodrigues Tsukimoto

Avaliação de novos métodos para a cultura de anaeróbios

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Rossi

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tsukimoto, Eliane Rodrigues

Avaliação de novos métodos para a cultura de
anaeróbios / Eliane Rodrigues Tsukimoto. -- São
Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Flávia Rossi.

Descritores: 1.Bactérias anaeróbias 2.Meios de
cultura 3.Crescimento bacteriano 4.Espectrometria
de massas por ionização e desorção a laser assistida
por matriz 5.Diagnóstico clínico 6.Técnicas de
laboratório clínico 7.Infecções por bacteroides
8.Infecções por clostridium

USP/FM/DBD-121/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

A versão original encontra-se disponível na Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD).

Dedicatória

A minha família que desde cedo me
ensinou os caminhos da honestidade e do amor
e ao meu afilhado pela sua luz e alegria de viver.

Agradecimentos

A pós-graduação é muito mais do que a vontade de contribuir cientificamente, reflete o desejo de amadurecer pessoal e profissionalmente. E ao final desse processo, laborioso, cheio de desafios e ganhos, é inevitável a reflexão dos caminhos percorridos e somente uma palavra define meu estado de espírito: Gratidão.

A Deus por estar sempre presente em minha vida trazendo todas as respostas que procuro das formas mais sublimes e inesperadas, e por todos os dias nutrir em mim a certeza de que não há realização maior do que ao cair da noite, perceber que consegui ser útil a alguém e um pouco melhor do que ontem.

A minha família pelo apoio incondicional, por ser à base da minha existência e a fonte motivadora de cada nova conquista.

Aos meus amigos sempre tão presentes e amorosos.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela excelência dos serviços prestados e por representar até hoje a esperança de muitas famílias. Minha mãe sempre nos contou que quando meu avô, que infelizmente não conheci, precisava de internação e o traziam para cá, ficavam sossegados, pois sabiam que ele voltaria para casa. Talvez essa vivência, incentivou minha mãe a dedicar sua vida a essa Instituição, 40 anos atuando de forma excepcional na reabilitação física e mental dos pacientes, e com certeza é uma das coisas que mantém viva em nós a busca por constante aprimoramento.

Meus agradecimentos a todos os colaboradores da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP que me receberam recém-saída da universidade, e com paciência e dedicação dividiram comigo seus conhecimentos.

A todos os funcionários do setor de Microbiologia por tudo que me ensinaram e ensinam a todo o momento, pelos inúmeros aprendizados para a vida que obtenho através das histórias e vivências de cada um e pela parceria nas lutas e conquistas diárias.

Ao Dr. Alexandre Fortini por ter sido um chefe tão humano e pela franca conversa que tivemos quando me desliguei do Hospital Santa Virgínia por não conseguir conciliar a carga horária com o HC, até hoje me lembro de suas palavras como se estivesse direcionando-as a sua própria filha.

A Dra. Thais Romano Sabato Di Gioia e a Dra. Maria Rita Elmor de Araújo por todo apoio e torcida.

Ao Dr. João Nóbrega de Almeida Jr. por ser um constante exemplo em tudo que faz, por sempre me auxiliar e pelas suas valiosas contribuições.

Ao Dr. André Mario Doi que esteve comigo em um dos mais importantes momentos da minha carreira: meu primeiro congresso internacional e sem o qual isso não seria possível e a Raquel Girardello por todo auxílio nesse evento e pela amizade ali iniciada.

A Dra. Denise Andreazzi por muitas vezes me enxergar além do que meus olhos me permitiam ver, me encorajando e conduzindo nesse caminho de descoberta.

A Dra. Flávia Rossi pela contribuição na minha formação como microbiologista me concedendo inúmeras oportunidades de crescimento

intelectual, sempre confiando e me incentivando a expandir cada vez mais minhas capacidades. Sinto-me lisonjeada em tê-la como orientadora dessa dissertação, como parceira e como aluna.

Para mim, o melhor professor não é aquele que somente ensina o conteúdo de forma didática, é aquele que instiga o aluno a “pensar fora da caixa”, a ir além e vencer suas próprias limitações ilusórias norteando esse processo. Essa contribuição científica é resultado de um dia normal de trabalho em que a Dra. Flávia me perguntou o que eu poderia propor para melhorar meu fluxo de rotina, fornecendo um resultado mais rápido para o paciente sem interferir na qualidade e reduzindo o custo do exame...trabalhamos firme nesse propósito e aqui estamos nós! Mais do que tudo, agradeço sua amizade; nunca me esquecerei do seu olhar me observando de longe na seção de pôster do ICAAC, momentos que não precisam ser traduzidos em palavras para entendermos o que significam.

A Dra. Maria Aparecida Basille pela delicadeza em que mostrou a mim e aos demais alunos da disciplina de preparação pedagógica a importância e o orgulho de participar e representar a casa de Arnaldo, nos mostrando novos caminhos, que ligam a assistência em saúde à parte acadêmica, pelos quais quero percorrer.

“Já somos o que seremos, só estamos nos descobrindo”.

Walter Fernandes

Normatização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Comittee of Medical Journal Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011

Sumário

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Principais anaeróbios e relação com processos infecciosos.....	3
1.3 Diagnóstico Laboratorial.....	8
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Local do estudo	23
4.2 Desenho do estudo	23
4.3 Etapa 1 – Modificação do Caldo Thioglicolato (CT)	24
4.4 Análise Estatística para a comparação do CT frente ao CTM.....	28
4.5 Etapa 2 - Comparação do ANC (Vitek 2) frente ao MALDI-TOF (Vitek MS).....	28
4.6 Metodologia molecular de sequenciamento do 16S rRNA	32
4.8. Avaliação do impacto econômico das metodologias propostas	33
5. RESULTADOS	37
5.1 Composição e Avaliação do CT Modificado (CTM)	37

5.2 Avaliação do ANC (Vitek 2- <i>bioMérieux, France</i>) e MALDI –TOF (Vitek MS - <i>bioMérieux, France</i>)	44
5.3 Verificação do impacto econômico das metodologias propostas	48
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	67
ANEXOS	71

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

%. Porcentagem

°C. Grau centrígrado

>. Maior

<. Menor

µg. Micrograma

mL. Mililitros

et al. e outros

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária

ASANA. Agar sangue anaeróbio

CAER. Cultura de aeróbios

CANA. Cultura de anaeróbios

COX. Agar chocolate

CT. Caldo Thioglicolato

CTM. Caldo Thioglicolato modificado

GRAM. Exame bacterioscópico

DLC. Divisão de Laboratório Central

HCFMUSP. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ICHHC. Instituto Central

ICESP. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

InCor. Instituto do Coração

IPQ. Instituto de Psiquiatria

ICr. Instituto da Criança

IOT. Instituto de ortopedia e traumatologia

InRea. Instituto de Medicina Física e Reabilitação

CO₂. Gás carbônico

O₂. Oxigênio

ID. Identificação

Vitek 2. Equipamento para identificação bacteriana através do método colorimétrico

Vitek MS. Equipamento para identificação bacteriana através do método de espectrometria de massas.

ANC. Cartão de identificação de bactérias anaeróbias contendo provas bioquímicas e enzimáticas.

Vitek 2 AES. Base de dados do equipamento Vitek 2

Myla. Base de dados do equipamento Vitek MS voltado para parte clínica

Saramis. Base de dados do equipamento Vitek MS voltado para pesquisa científica.

MALDI-TOF. “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight” .

UV. Luz ultravioleta

EM. Espectro de massa

TAT. “Turn around time” – Tempo de resposta

ATCC. “American Type Culture Collection”

CAZ. Antibiótico Ceftazidima

CTX. Antibiótico Ceftriaxona

CRO. Antibiótico Cefuroxima

GE. Antibiótico Gentamicina

AMI. Antibiótico Amicacina

CIP. Antibiótico Ciprofloxacina

LEV. Antibiótico Levofloxacina

AZT. Antibiótico Azitromicina

MB. Material biológico

+. Não inibiu o crescimento de anaeróbios

-. Inibiu o crescimento de anaeróbios

S. Sensibilidade

E. Especificidade

VPP. Valor preditivo positivo

VPN. Valor preditivo negativo

FP. Falso positivo

Lista de Figuras

Figura 1- Características morfológicas visualizadas pela coloração de Gram específicas de: A) <i>Clostridium clostridioforme</i> / B) <i>Clostridium tertium</i>	11
Figura 2 - Teste de avaliação de inibição dos anaeróbios (15 cepas).....	26
Figura 3- Fluxo de Avaliação do CTM frente ao CT.	27
Figura 4- Método automatizado ANC (Vitek 2 bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)	29
Figura 5- Método de espectrometria de massas MALDI-TOF (Vitek MS - bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)	30
Figura 6- Fluxo de identificação dos microrganismos anaeróbios.ANC (Vitek 2), MALDI-TOF (Vitek MS).	31
Figura 7- Fluxograma Vigente da Cultura de Anaeróbios no Laboratório de Microbiologia DLC- HCFMUSP.	34
Figura 8- Caldo Thioglicolato Modificado HCFMUSP (CTM= CT + ATBs).	39
Figura 9- Aspecto macroscópico das amostras.....	40
Figura 10- Projeção da utilização de recursos gastos anualmente com as culturas negativas para microrganismos anaeróbios utilizando o CT e CTM ...	49
Figura 11- Projeção da utilização de recursos gastos anualmente com as culturas positivas para microrganismos anaeróbios utilizando o ANC (Vitek 2) e MALDI TOF (Vitek MS).	51
Figura 12- Características morfológicas visualizadas pela coloração de Gram específicas de: A) <i>Veillonella parvula</i> / B) <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> /C)	

<i>Actinomyces viscosus</i> / D) <i>Fusobacterium nucleatum</i> /E) <i>Clostridium</i> <i>sporogenes</i>	73
Figura 13- Exemplo de Triagem do material originado do Caldo Thioglicolato Turvo.	75
Figura 14- Exemplo de Reisolamento das colônias suspeitas de anaeróbi.....	76
Figura 15- Exemplos do teste de aerotolerância das colônias suspeitas reisoladas.	77

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Avaliação do crescimento dos anaeróbios em tubos com CT e CT com diferentes antibióticos (n=15).....	38
Tabela 2 – Resultados da triagem das culturas anaeróbias utilizando o CT e o CTM (n=159).....	42
Tabela 3 - Avaliação do TAT de Liberação Final das Culturas de Anaeróbios (n=159).....	43
Tabela 4 - Performance do ANC (Vitek 2) e MALDI- TOF (Vitek MS) para a identificação dos 421 anaeróbios isolados	45
Tabela 5 - Resultados discrepantes ou com baixa discriminação das espécies obtidas com ANC Vitek 2 e MALDI-TOF Vitek MS, submetidas ao sequenciamento de 16S rRNA	47
Tabela 6 - Custo direto dos insumos para a realização da CANA e utilizados no estudo.....	78

Resumo

Tsukimoto ER. *Avaliação de novos métodos para a cultura de anaeróbios* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: As infecções por bactérias anaeróbias são geralmente de origem endógena, polimicrobianas e mistas. Devido a sua natureza fastidiosa, essas bactérias necessitam de uma prévia incubação em meios líquidos enriquecidos, como o caldo Thioglicolato (CT) para serem recuperadas, o isolamento desses microrganismos é trabalhoso e o tempo de resposta – TAT (turn around time) estendido desse exame pode estar associado a falhas terapêuticas e ao aumento da resistência bacteriana. A cultura de anaeróbios (CANA) ainda é um desafio para os laboratórios clínicos de rotina e novas estratégias para diminuir o TAT são fundamentais para que esse exame forneça um impacto clínico significativo. **OBJETIVO:** Otimizar o processo de triagem da CANA pela modificação do CT; comparar a identificação dos anaeróbios pelas metodologias fenotípicas ANC (Vitek 2- bioMérieux, France) e MALDI-TOF (Vitek MS - bioMérieux, France) e verificar o impacto econômico das ações propostas. **MÉTODOS:** O caldo de triagem CT foi modificado eluindo individualmente discos comerciais de antibióticos (em concentrações fixas) selecionados por apresentarem baixa ou nenhuma ação contra microrganismos anaeróbios e com um bom espectro de ação para os principais aeróbios associados em culturas mistas e foram escolhidos aqueles que após uma bateria de testes frente a 15 cepas dos principais anaeróbios envolvidos em infecções humanas mantiveram a viabilidade inicial. O caldo Thioglicolato modificado (CTM) foi composto pela adição dos antibióticos que apresentaram a melhor “performance” acima descrita. A sensibilidade e especificidade do CTM foram avaliadas paralelamente com CT na rotina de CANA do HCFMUSP. Para avaliar a identificação fenotípica, 421 anaeróbios isolados no período de seis meses foram submetidos a identificação pelo ANC (Vitek 2) e MALDI-TOF (Vitek MS). Os resultados discordantes ou com baixa discriminação da espécie foram avaliados pelo sequenciamento 16S rRNA. O impacto econômico da introdução do CTM bem como os custos diretos da identificação pelo MALDI-TOF foram avaliados. **RESULTADOS:** O CTM foi composto por amicacina, gentamicina e aztreonam. Das 159 amostras clínicas triadas pelo CT e CTM, 11 (7%) foram positivas para CANA com as mesmas espécies isoladas em ambos os meios. Utilizando o CTM, foi obtida uma redução dos falsos positivos de 97 (61%) para 69 (43%) quando comparado ao CT ($p < 0,05$). O TAT do resultado negativo da CANA com o CTM foi reduzido de 14 para sete dias em 28 (18%) amostras; o CTM permitiu a liberação do resultado positivo da CANA 48 horas à frente do CT. A sensibilidade do CTM foi igual ao CT, porém a especificidade foi superior em 19%. Das 421 cepas avaliadas, 35 foram identificadas somente pelo MALDI-TOF (Vitek MS) sendo que uma (*Clostridium innocum*) foi identificada somente pelo sequenciamento 16S rRNA. Das 386 avaliadas por ambas as metodologias, houve uma concordância de 97% e os resultados das 13 (3%) cepas submetidas ao sequenciamento foram concordantes em 92% com o MALDI-TOF (Vitek MS) que promoveu a redução do TAT do resultado positivo em cinco dias.

A implementação do CTM possibilitou uma redução de custos nessa amostragem, de R\$ 2.240,00 e a identificação pelo MALDI-TOF proporcionou uma economia de R\$ 7.786,00. Considerando os valores econômicos encontrados nesse estudo e projetando-os nas estatísticas de CANA do HCFMUSP em 2017, o CTM poderia proporcionar uma economia de R\$ 132.560,00 /ano e o MALDI-TOF uma redução nos gastos de R\$ 13.579,00/ano **CONCLUSÕES:** A padronização e implementação do CTM permitiu um aumento significativo de especificidade da cultura anaeróbia com redução do TAT e dos custos. A utilização do MALDI-TOF diminuiu o TAT das identificações aliado a uma melhor performance de forma custo efetiva.

Descritores: bactérias anaeróbias; meios de cultura; crescimento bacteriano; espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz; diagnóstico clínico; técnicas de laboratório clínico; infecções por bacteroides; infecções por clostridium.

Abstract

Tsukimoto ER. *Evaluation of new methods for anaerobic bacterial culturing* [dissertação]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Anaerobic bacterial infections are usually of endogenous origin, polymicrobial and mixed. Because of their fastidious nature, these bacteria require prior incubation in enriched liquid media, such as Thioglycolate broth (TB) to be recovered, the isolation of these microorganisms is laborious, and the TAT (turn around time) extended time of this examination may be associated with therapeutic failures and increased bacterial resistance. Anaerobic culture (AC) is still a challenge for routine clinical laboratories, and new strategies for lowering TAT are critical to provide a significant clinical impact. **OBJECTIVE:** To optimize the AC screening process by modifying the TB; Compare anaerobical identification between (Vitek 2- bioMérieux, France) and MALDI-TOF (Vitek MS - bioMérieux, France) and to verify the economic impact of the proposed actions. **METHODS:** TB broth was modified by eluting individually antibiotic commercial discs (at fixed concentrations) selected for low or no action against anaerobic microorganisms and with a good action spectrum for the main associated aerobes in mixed cultures. Those who maintained the initial viability after a battery of tests against 15 strains of the major anaerobes involved in human infections were selected. Modified Thioglycolate Broth (MTB) was composed of the antibiotics that presented the best performance described above. The sensitivity and specificity of MTB were evaluated in parallel with TB in the HCFMUSP AC routine. To evaluate the phenotypic identification, 421 anaerobes isolated in the six-month period were submitted to identification by ANC (Vitek 2) and MALDI-TOF (Vitek MS). Discordant results or those with low discrimination of the species were submitted to 16S rRNA sequencing. The economic impact of the introduction of MTB as well as the direct costs of MALDI-TOF identification were assessed. **RESULTS:** MTB was composed of amikacin, gentamicin and aztreonam. Of the 159 clinical samples screened by TB and MTB, 11 (7%) were positive for AC with the same species isolated in both media. Using MTB, a reduction of false positives was obtained from 97 (61%) to 69 (43%) when compared to TB ($p < 0.05$). The TAT of the negative result of the AC with the MTB was reduced from 14 to 7 days in 28 (18%) samples; the MTB allowed the release of the AC positive result 48 hours ahead of the TB. The sensitivity of MTB was equal to TB, but the specificity was higher in 19%. Of the 421 strains evaluated, 35 were identified only by MALDI-TOF (Vitek MS) and one (*Clostridium innocum*) was identified only by 16S rRNA sequencing. Of the 386 evaluated by both methodologies, there was a concordance of 97% and the results of the 13 (3%) strains submitted to the sequencing were concordant in 92% with the MALDI-TOF (Vitek MS) that promoted TAT of the positive result reduction in five days. The implementation of the MTB made possible a reduction of costs in this sampling, of US \$ 677,00 and the identification by MALDI-TOF provided a saving of US \$ 2354,00. Considering the economic values found in this study and projecting them in the HCFMUSP AC statistics in 2017, the MTB could provide savings of US \$

40,070.00 / year and MALDI-TOF a reduction in expenses of US \$ 4,100.00 / year. **CONCLUSIONS:** Standardization and implementation of MTB allowed a significant increase of anaerobic culture specificity with TAT and costs reduction. The use of MALDI-TOF reduced the TAT of the identifications and also resulted in a better performance in a cost effective way.

Descritores: bacteria, anaerobic ; culture media; bacterial growth; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization; clinical diagnosis; clinical laboratory techniques; bacteroides infections; *clostridium* infections.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

As bactérias anaeróbias constituem um grupo de microrganismos que não utilizam o oxigênio para o seu metabolismo e sofrem danos oxidativos letais quando expostos a ele, pois apresentam deficiência de enzimas protetoras como a superóxido dismutase, peroxidase e a catalase capazes de transformar os radicais livres em produtos não tóxicos (Rolfe *et al.*, 1978).

O primeiro registro de microrganismos capazes de crescer na ausência de oxigênio ou em uma atmosfera rarefeita data de 1680 por Leeuwenhoek; Quase um século depois, Spallanzani, voltou a descrever seres microscópicos viáveis após 16 dias em alto vácuo, no entanto, essas observações ficaram negligenciadas ou esquecidas até 1861, quando Louis Pasteur apresentou à Academia de Ciências de Paris a teoria do crescimento anaeróbio, e introduziu os termos: aeróbios, aeróbios facultativos e anaeróbios (Sonnenwirth *et al.*, 1972; Margaret *et al.*, 2003).

O primeiro caso de infecção em humanos por anaeróbios foi relatado por Veillon e Zuber em 1893 ocasionada por *Bacteroides fragilis* e desde então diversos anaeróbios começaram a ser descritos, assim como meios específicos e métodos de cultivo foram propostos. A técnica de rolamento em túbulos de vidro com cânulas de gaseificação (Método de Hungate), o sistema de substituição atmosférica através de ciclos automatizados (Anoxomat system), o desenvolvimento de câmaras de anaerobiose, o uso de meios pré-reduzidos

(PRAS) e a introdução das jarras de anaerobiose por J. McIntosh e P. Fildes, em 1916, com o uso de geradores químicos criando uma atmosfera com menos de 1% de oxigênio, são algumas das técnicas criadas com essas finalidades (Sonnenwirth *et al.*, 1972; Bartlett JG, 2002; Margaret *et al.*, 2003).

Historicamente, o período de 1909 a 1938, foi marcado por uma variedade de estudos clínicos sobre microrganismos anaeróbios, no entanto a falta de uma nomenclatura padronizada e a dificuldade de cultivo levaram ao abandono essa área da microbiologia. O ano de 1965 foi marcado pelo renascimento das práticas clínicas da cultura de anaeróbios, liderado principalmente por Sidney Finegold, referido muitas vezes como o pai dos anaeróbios e desde então muitos avanços foram publicados principalmente na Europa e nos Estados Unidos (Bartlett JG, 2002; Bharadwaj R, 2012).

No Brasil e nos demais países da América Latina, os estudos clínicos de anaeróbios são pouco explorados bem como a prática da cultura de anaeróbios nos laboratórios de rotina assistencial limitando o conhecimento da epidemiologia local (Rodríguez-Cavallini *et al.*, 2011, Ignacio *et al.*, 2015; Boente *et al.*, 2010).

De 2002 a 2005 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - Brasil) realizou um inquérito nacional de laboratórios de microbiologia pertencentes a hospitais com 10 ou mais leitos de UTI e hospitais sentinelas das cinco regiões do Brasil. O estudo divulgou um total de 464 laboratórios realizando exames bacteriológicos, 67,8% pertencentes à região sudeste, 18,5% a região sul, 7,4% ao nordeste, 3,4% ao norte e 3,0% ao centro-oeste. O estado de São Paulo concentrou o maior número de unidades (40%) seguido pelo estado do Rio de Janeiro com cerca de 15% (ANVISA, 2007).

Somente 27% (124) desses laboratórios declararam realizar a cultura para anaeróbios, no entanto, 30% (37) não apresentavam infraestrutura mínima para a realização desse exame, isto é, qualquer metodologia capaz de reduzir a concentração de oxigênio criando uma atmosfera de anaerobiose. Com relação a identificação dos anaeróbios, 90% (112) realizavam somente a identificação presuntiva e apenas 4% (20) declararam utilizar sistema automatizado para anaeróbios (ANVISA, 2007).

Esse levantamento não especificou quais metodologias foram utilizadas e a ocorrência dos microrganismos recuperados, mas evidenciou o quanto a cultura de anaeróbios, no Brasil, carece de aprimoramento e expansão.

1.2 Principais anaeróbios e relação com processos infecciosos

Os microrganismos anaeróbios são intimamente relacionados com a microbiota humana e se comportam como patógenos oportunistas, sendo pouco encontrados nas infecções de origem exógenas. Esses microrganismos geralmente estão associados a diversos tipos de infecções em diferentes topografias como, por exemplo, pele, partes moles, região de cabeça e pescoço, pleuro-pulmonares, intra-abdominais, região pélvica, ósseas e sanguíneas. A mortalidade associada a infecções causadas por anaeróbios pode variar amplamente de acordo com local de infecção e da condição imunitária do doente (Brook *et al.*, 2010; Mikamo *et al.*, 2011; Kierzkowska *et al.*, 2011; García-Sánchez *et al.*, 2013).

As infecções por anaeróbios se caracterizam por serem frequentemente piogênicas, polimicrobianas e mistas o que pode contribuir para uma maior

gravidade e rápida evolução, uma vez que aeróbios e anaeróbios agem de maneira sinérgica aumentando o potencial de virulência, sendo capazes de promover processos invasivos e agressivos que resultam, muitas vezes, em perda funcional, motora e até mesmo na amputação de membros e dos tecidos envolvidos. Nessa interação os anaeróbios contribuem de forma mais intensa e efetiva, pois apresentam potentes fatores de virulência e produzem diversas toxinas e enzimas capazes de promover a destruição tecidual como a fosfolipase C, fibrinolisinases, hemolisinas, heparinases e neuraminidases, além das enterotoxinas encontradas em algumas estirpes de *B. fragilis* (Robertson *et al.*, 2006; Wexler *et al.*, 2007; Boente *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2013).

Porphyromonas spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Actinomyces* spp. constituem a microbiota oral e do trato respiratório superior e estão frequentemente envolvidos em infecções acima do diafragma, já o grupo *Bacteroides fragilis* e as espécies de *Clostridium* spp. constituem isolados representativos nas infecções do trato gastrointestinal e região pélvica, sendo também os mais frequentes anaeróbios recuperados de pacientes com neoplasias ou transplantados (Boente *et al.*, 2010; Dubreuil *et al.*, 2010; Mikamo *et al.*, 2011; Nakano *et al.*, 2011).

O grupo *Bacteroides fragilis* é, sem dúvida, o mais frequente isolado em amostras clínicas. Esse grupo compreende uma variedade de espécies, entre elas: *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformes*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, e *Parabacteroides distasonis* que diferem entre si desde características morfo tintoriais visualizadas pela coloração de Gram, fatores de virulência, mecanismos de resistência e conseqüentemente o comportamento frente aos

diversos antimicrobianos. *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Parabacteroides distasonis*, por exemplo, apresentam um perfil mais resistente em comparação as demais espécies, o que destaca a importância de identificar corretamente o gênero e a espécie, para otimizar a escolha terapêutica (Park *et al.*, 2009; Mikamo *et al.*, 2011; Kierzkowska *et al.*, 2011; Papaparaskevas, *et al.*, 2011; Rodríguez-Cavallini *et al.*, 2011).

O gênero *Clostridium* spp. é extremamente heterogêneo com mais de duzentas espécies, incluindo as formadoras e as não formadoras de esporos, capazes de ocasionar uma série de infecções com altas taxas de morbidade e mortalidade como, por exemplo, pneumonia aspirativa, abscessos, infecções ósseas, de partes moles e o aborto séptico causado pelo *C. sordelli* (Fisher *et al.*, 2005).

A fascíte necrotizante, gangrena gasosa e a síndrome de Fournier são apresentações clínicas representativas da grave interação dos anaeróbios nos processos mistos com elevadas taxas de mortalidade que podem variar de 40% a 67%. Essa síndrome tem origem idiopática e envolve principalmente enterobactérias, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp., afetando as regiões genital, perianal e perineal, levando a trombose dos vasos cutâneos e subcutâneos com consequente necrose e rápida extensão para a parede abdominal anterior e região dorsal podendo evoluir para sepse, falência múltipla dos órgãos e morte (Cardoso JB, 2007).

As infecções por *Fusobacterium* spp., por sua vez, tem crescido nas últimas décadas, particularmente a síndrome de Lemière, um quadro específico e geralmente monobacteriano que se inicia por uma amidalite e evolui com formação de abscesso, tromboflebite séptica da veia jugular interna e

bacteremia podendo se disseminar para diversos sítios, especialmente o pulmão (Kushawaha *et al.*, 2009; García-Sánchez *et al.*, 2013).

Os anaeróbios também estão implicados em infecções monobacterianas onde revelam ainda mais suas características patogênicas; o *Clostridium septicum*, por exemplo, é capaz de causar uma rápida infecção letal pela produção de uma toxina hemolítica e necrotizante, a alfa toxina (Kennedy *et al.*, 2005). O *Clostridium difficile* está associado à síndrome da colite pseudomembranosa e representa um problema clínico importante: O surgimento e disseminação do biotipo 027 (*C.difficile* B1/NAP1/027/toxinotipo III) de alta agressividade e potencial epidêmico relatado nos Estados Unidos, Europa e América Latina sendo descrito na Costa Rica, Panamá e Chile. Essa cepa produz em maior quantidade as toxinas A e B além de uma toxina binária levando a quadros diarreicos graves associados a falhas terapêuticas e uma maior recorrência (Balassiano *et al.*, 2012; García-Sánchez *et al.*, 2013; Tickler *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017).

Muitas vezes considerado como colonizante o *Propionibacterium acnes* vem se consolidando como importante patógeno principalmente nas endoftalmites, infecções ósseas e associadas a próteses e aos implantes inclusive com formação de biofilme (Achermann *et al.*, 2014).

Os cocos Gram positivos anaeróbios, como por exemplo, *Finnegoldia magna* e *Parvimonas micra*, bem como, a *Veionella parvulla*, único coco Gram negativo anaeróbio, são mais frequentemente associados a infecções pleuropulmonares e de pele e partes moles (Park, *et al.*, 2009; Kierzkowsa *et al.*, 2011; Mikamo *et al.*, 2011; Papaparaskevas *et al.*, 2011; García-Sánchez *et al.*, 2013).

As endocardites por anaeróbios, principalmente por *P.acnes*, *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *B.fragilis* e *Fusobacterium* spp., podem apresentar sérias complicações como a destruição valvular, múltiplos aneurismas, abscessos no anel aórtico, choque cardiogênico, disritmias e choque séptico, com taxa média de mortalidade de 21 a 43% que podem variar de 46 a 75% quando ocasionadas por *B. fragilis* ou *F. necrophorum* (Brook *et al.*, 2008; Samant *et al.*, 2010).

A taxa de moraliidade da bacteremia por anaeróbios varia de 14 a 60% sendo menos prevalente em crianças e idosos e mais reportada em pacientes que apresentam doenças subjacentes e neoplasias (Brook *et al.*, 2010; García-Sánchez *et al.*, 2013).

De forma geral, as infecções por anaeróbios apresentam taxas significativas de morbidade e mortalidade sendo as neoplasias, doenças hematológicas, transplantes, procedimentos cirúrgicos, diabetes mellitus, uso de agentes citotóxicos e corticoides, os fatores predisponentes mais relacionados. Diante da suspeita de uma infecção por anaeróbios, o médico muitas vezes se baseia nas características clínicas e epidemiológicas da infecção para empiricamente decidir a escolha terapêutica. Como consequência, muitas vezes antibióticos de amplo espectro são utilizados por falta de uma identificação específica, o que pode aumentar os custos na assistência médica e a possibilidade de falhas terapêuticas, uma vez que a resistência de anaeróbios à clindamicina, metronidazol e aos carbapenêmicos tem sido relatada de forma crescente em todo mundo (Brook *et al.*, 2010; Dubreuil *et al.*, 2010).

Em 2016 o Laboratório de Microbiologia do HCFMUSP recebeu 11.513 amostras para a cultura de anaeróbios de diversos sítios anatômicos sendo isolados 906 anaeróbios. O grupo *Bacteroides fragilis* foi o mais frequentemente isolado correspondendo a 47% (431), seguido por *Prevotella* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp. e *Propionibacterium* spp. Mais de 80% dessas infecções foram polimicrobianas e mistas, associadas em sua maioria ao grupo das enterobactérias. No mesmo período, das 4.450 hemoculturas positivas, foram isolados 135 anaeróbios representando 3% do total de positividade das amostras, sendo o grupo *Bacteroides fragilis* o mais prevalente, seguido por *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp..

1.3 Diagnóstico Laboratorial

Nas últimas duas décadas, estudos têm demonstrado que os métodos de cultivo para as bactérias anaeróbias diferem em vantagens e desvantagens, e que cabe a cada laboratório avaliá-los de acordo com o contexto em que está inserido uma vez que a cultura de anaeróbios é um exame laborioso e com um custo elevado (Wexler *et al.*, 2007; Rodríguez-Cavallini *et al.*, 2011; Kierzkowska *et al.*, 2011).

As culturas de anaeróbios (CANA) demandam etapas manuais trabalhosas na rotina microbiológica e a qualidade deste exame depende de um processo pré-analítico de coleta e transporte bastante criterioso. Nas culturas polimicrobianas e mistas a diferenciação do anaeróbio requer um

tempo adicional, devido a subseqüentes etapas de isolamento e provas de aerotolerância para excluir os aeróbios. O tempo total dessas culturas, definido com a sigla TAT (Turn Around Time – Tempo de Resposta), costuma variar de 7 a 14 dias (Church D, 2015).

O processo analítico da CANA adotado na rotina da Seção de Microbiologia do HCFMUSP segue as diretrizes básicas da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM). O Procedimento Operacional Padrão (POP) está descrito e detalhado no anexo I e sua performance é certificada anualmente através de uma auditoria externa internacional do Colégio Americano de Patologia (CAP).

Na rotina do HCFMUSP, a cultura de anaeróbios inclui as etapas de recuperação, triagem, isolamento e identificação de gênero e espécie. Para a recuperação, os materiais clínicos (biópsias, aspirados e líquidos biológicos) enviados para CANA são inicialmente inoculados em um tubo com meio líquido enriquecido denominado Caldo Thioglicolato (CT) que contém peptona de caseína, extrato de levedura e glicose. Esse meio é incubado em estufa ar ambiente a 37°C por um período de até sete dias. O CT possui um importante papel na cultura de anaeróbios, pois além de assegurar a viabilidade bacteriana e proporcionar o aumento do inóculo é um meio de triagem que permite a diferenciação macroscópica entre tubos límpidos e turvos, isto é, entre culturas negativas e possivelmente positivas para anaeróbios; Quando os tubos de CT permanecem límpidos ao final do período de incubação total, sinalizam que não há presença de bactérias aeróbias e/ou anaeróbias e a cultura é liberada como negativa (Church D, 2015).

O CT, no entanto, pode favorecer também o crescimento de bactérias aeróbias nas culturas mistas e conseqüentemente sua turvação pode não significar a presença exclusiva de anaeróbios, tornando necessária a realização do teste de aerotolerância e o subcultivo em meios de cultura sólidos de todas as amostras de CT turvas. Quando o teste de aerotolerância é negativo o isolamento dos possíveis microrganismos anaeróbios, necessitam de etapas subsequentes de testes de aerotolerância e isolamentos em agar sangue anaeróbio incubados em atmosfera livre de O₂ composta por jarras, indicadores e geradores químicos de anaerobiose. Todo esse processo de diferenciação pode levar até quatro dias para que haja crescimento da bactéria em anaerobiose e em quantidade suficiente para que seja realizada a identificação bacteriana (Jousimies-Somer *et al.*, 2002).

A identificação fenotípica de microrganismos anaeróbios é classicamente realizada por um conjunto de características apresentadas na coloração de Gram, morfologia macroscópica das colônias em meios sólidos e perfil bioquímico, no entanto, muitos anaeróbios são inativos bioquimicamente e apresentam colônias com morfologia variável tanto nos meios sólidos quanto na bacterioscopia, apresentando-se Gram variáveis ou Gram negativos mesmo pertencentes a gêneros sabidamente Gram positivos como o *Clostridium tertium* e o *Clostridium clostridioforme* (Figura 1), exigindo muita expertise técnica (Li *et al.*, 2014).

Figura 1- Características morfológicas visualizadas pela coloração de Gram específicas de: A) *Clostridium clostridioforme* / B) *Clostridium tertium*.
FONTE: JCM Catalogue of strains (<http://www.jcm.riken.jp/>).

A análise do perfil bioquímico pode ser realizada através de várias provas manuais ou de métodos semi automatizados como, por exemplo, BBL Crystal ANR (Becton Dickinson), Remel RapID ANA II (Oxoid-Thermo Fisher, Cambridge, UK) e através do cartão anaero-card ANC - Vitek 2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) um sistema fechado constituído por provas bioquímicas e enzimáticas miniaturizadas. Esses métodos necessitam de 24 a 48 horas para finalizar a identificação bacteriana computadorizada e apresentam uma boa performance, mas necessitam de um alto inóculo bacteriano (escala 2,70 a 4,0 de Mc Farland - cerca de $8 \text{ a } 10 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias - UFC) o que requer dias extras de incubação e novos replaqueamentos em meios sólidos, para alcançar o crescimento adequado, gerando consequentemente um aumento no tempo de liberação de resultados finais ou até mesmo a perda da viabilidade da cepa, tornando a identificação inviável (Blairon *et al.*, 2010; Rennie *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, o uso das técnicas moleculares e de sequenciamento trouxeram grandes mudanças na taxonomia dos anaeróbios

inclusive com a descrição de novos gêneros e espécies, porém trata-se ainda de uma metodologia pouco acessível aos laboratórios de rotina (Nagy *et al.*, 2012).

Recentemente novas metodologias de identificação fenotípica de microrganismos baseados em espectrometria de massas como o MALDI-TOF (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry”) estão sendo implementadas na rotina laboratorial microbiológica. Este equipamento utiliza a análise da expressão proteica dos microrganismos e vêm revolucionando a identificação bacteriana. Diversos autores relatam mudanças significativas no diagnóstico de infecções por aeróbios, anaeróbios, micobactérias e fungos utilizando essa metodologia. Os resultados são mais específicos e permitem a identificação utilizando inóculos menos densos e com um TAT de até 10 minutos (Veloo *et al.*, 2011; Versalovic *et al.*, 2012; Nagy *et al.*, 2012).

A identificação das espécies dos microrganismos anaeróbios é muitas vezes desvalorizada, no entanto a rápida e acurada identificação dessas bactérias pode estar diretamente relacionada ao sucesso terapêutico (Ge *et al.*;2017).

2. JUSTIFICATIVA

A maioria das amostras clínicas enviadas para CANA no HCFMUSP são polimicrobianas e mistas, isto é, possuem microrganismos aeróbios e anaeróbios no mesmo material, o que dificulta o isolamento específico de anaeróbios.

Apesar dos recentes avanços nas metodologias de identificação das bactérias anaeróbias, a complexidade das etapas de recuperação e isolamento dos anaeróbios envolvidos em um contexto misto faz com que essa cultura seja muito trabalhosa, onerosa e demorada com um TAT de até 14 dias (Cardoso JB, 2007; Kierzkowska *et al.*, 2011; Mikamo *et al.*, 2011).

Novas estratégias analíticas para reduzir o TAT são desejáveis para tornar o resultado final da CANA um diferencial à conduta clínica, possibilitando a rápida intervenção para a resolução dos processos infecciosos.

3. OBJETIVOS

1. Otimizar o procedimento de triagem das culturas de anaeróbios propondo e avaliando uma modificação no Caldo Thioglicolato (CT).
2. Comparar o desempenho de identificação dos microrganismos anaeróbios através de metodologias fenotípicas: ANC (Vitek 2-bioMérieux) e MALDI-TOF (Vitek MS - bioMérieux).
3. Avaliar o impacto econômico das ações acima propostas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um complexo hospitalar público, universitário e terciário com 2.500 leitos que compreende oito institutos hospitalares, sendo um hospital geral central (IHC) e outros especializados em doenças do coração (InCOR), pediatria (ICr), ortopedia (IOT), medicina física e reabilitação (InRea), psiquiatria (IPQ), radiologia (IOT) e neoplasias (ICESP) e dois hospitais auxiliares de Cotoxó e Suzano.

A seção de Microbiologia atende todo o complexo HCFMUSP e recebe cerca de 11.500 amostras/ano para a cultura de anaeróbios.

4.2 Desenho do estudo

O presente estudo tem caráter experimental, analítico e prospectivo sendo efetuado em duas etapas distintas em períodos e com amostragens diferentes.

4.3 Etapa 1 – Modificação do Caldo Thioglicolato (CT)

Para compor a modificação do Caldo Thioglicolato USP (Oxoid, Basingstoke, England) foram escolhidos antibióticos para serem eluídos a esse meio; para isto, foi realizada uma bateria de testes utilizando oito diferentes discos comerciais de antibióticos distintos (Oxoid, Basingstoke, England) em concentrações fixas (escolhidos por apresentarem um bom espectro de ação para as bactérias aeróbias mais comumente associadas em infecções mistas e com baixa ou nenhuma ação contra os microrganismos anaeróbios) sendo eles: 1. Ceftazidima (30 µg), 2.Ceftriaxona (30 µg), 3.Cefepime (30 µg), 4.Gentamicina (10 µg), 5.Amicacina (30 µg), 6.Ciprofloxacina (5 µg), 7.Levofloxacina (5 µg) e 8. Aztreonam (30 µg).

Para testar o comportamento desses antibióticos frente as bactérias anaeróbias, elegemos 15 cepas dos principais anaeróbios envolvidos em infecções (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Parabacteroides distasonis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Finnegoldia magna*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium clostridiiforme* e *Bifidobacterium* spp.) que estavam armazenadas em freezer -70°C no banco de cepas pertencente ao Laboratório de Microbiologia do HCFMUSP.

Cada um dos microrganismos anaeróbios foi subcultivado em agar sangue anaeróbio (Columbia Blood Agar Base Oxoid, Basingstoke, England) e após a constatação da pureza dos isolados foi realizada uma suspensão do inóculo

bacteriano padronizada na escala 0,5 de McFarland em 1mL de solução salina (0,45% de NaCl). Essa suspensão foi adicionada a tubos contendo 9 mL CT e o disco de antibiótico testado (CT+ disco de antibiótico + microrganismo anaeróbio), os testes foram realizados em duplicata. O aspecto macroscópico do CT com o disco de antibiótico foi verificado após 48 horas de incubação em estufa ar ambiente a 35°C e classificado como límpido ou turvo. Todos os tubos pós-incubação foram inoculados em agar sangue anaeróbio em atmosfera de anaerobiose a 35°C por 48 horas verificando-se após este período a viabilidade das cepas. (Figura 2).

A composição final do CT modificado (CTM) foi definida combinando os discos de antibióticos que mantiveram a viabilidade de todas as cepas de anaeróbios testados (em duplicata).

Como controle de qualidade foram utilizadas cepas ATCCs de *Clostridium septicum* 12464 e *Bacteroides ovatus* 1304.

Figura 2 - Teste de avaliação de inibição dos anaeróbios (15 cepas). CT: Caldo Thioglicolato; ATBs: Antibióticos; CP: Controle de crescimento (CT sem antibiótico), CAZ: Ceftazidima, CTX: Ceftriaxone, CRO: Cefuroxima, GE: Gentamicina, AMI: Amicacina, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, AZT: Aztreonam, ASANA: Agar sangue anaeróbio.

Após a definição do CTM foi realizada uma avaliação comparativa de “performance” com o CT durante 15 dias consecutivos com todas as amostras clínicas enviadas para cultura de anaeróbios (Figura 3).

Figura 3- Fluxo de Avaliação do CTM frente ao CT. CANA: Cultura de anaeróbios. CT: Caldo Thioglicolato. CTM: Caldo Thioglicolato Modificado. ASANA: Agar Sangue Anaeróbio. COX: Agar Chocolate.

4.4 Análise Estatística para a comparação do CT frente ao CTM

Os dados obtidos, foram analisados de forma categórica através do teste de McNemar utilizando o software GraphPad - QuickCalcs.

4.5 Etapa 2 - Comparação do ANC (Vitek 2) frente ao MALDI-TOF (Vitek MS)

Durante um período de seis meses todos os microrganismos anaeróbios isolados de diversos materiais clínicos foram identificados pelo método de provas bioquímicas e enzimáticas do cartão ANC (Vitek 2) e pela espectrometria de massas MALDI – TOF (Vitek MS database 2.0) seguindo as recomendações do fabricante (bioMérieux, *France*).

O Cartão ANC compreende um conjunto de provas bioquímicas e enzimáticas miniaturizadas, esse método exige um alto inóculo bacteriano entre 2,70 a 3,30 na escala de Mc Farland em solução salina (0,45% de NaCl) que corresponde aproximadamente a $8-10 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os resultados de identificação pelo Vitek 2 são obtidos em 24 horas após a correlação com as características morfotintoriais visualizadas pela coloração de Gram e com o resultado do teste de aero tolerância informados manualmente pelo microbiologista (Figura 4). O banco de dados do equipamento Vitek 2 é gerenciado pelo software AES e permite a classificação dos resultados em quatro grupos: Identificação correta (excelente, muito boa, boa ou aceitável), baixa discriminação, erro de identificação e não identificado (Rennie *et al.*, 2008).

Figura 4- Método automatizado ANC (Vitek 2 bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)

Para a realização do MALDI TOF VITEK MS (BioMérieux, França) um spot bacteriano de 1 a 3 colônias é colocado sobre a placa de aço inoxidável (que acomoda até 48 testes simultaneos) com a adição da matriz para a ionização de proteínas (constituída por ácido α – ciano- 4- hidroxiciâmico – CHCA). No espectrômetro de massas, feixes de laser UV com comprimentos de onda pré-estabelecidos pelo fabricante são emitidos para cada analito. A matriz absorve a energia do laser e ocorre a desorção da amostra com formação de íons de massas diferentes. Estes íons viajam através do tubo de vácuo do equipamento e o tempo de voo (time of flight) é medido em massa (Figura 5). Os espectros de massa (EM) obtidos representam a impressão

digital da bactéria e quando comparados à biblioteca de referência do software Myla 2.0 (uso preconizado para laboratórios de rotina) ou RUO SARAMIS (utilizado em laboratórios de pesquisa) – Spectral Archive and Microbial Identification System (BioMérieux, França) permitem a identificação do gênero e da espécie em 10 minutos. Esses resultados são discriminados em três categorias: “good identification” quando o EM gerado encontra perfeita correlação (99,9% de probabilidade ou valor de confiança), “baixa discriminação” (>60%) ou “não identificado” (Justesen *et al.*, 2011; Nagy *et al.*, 2012).

Figura 5- Método de espectrometria de massas MALDI-TOF (Vitek MS -bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France)

Os resultados discordantes ou que apresentaram baixa discriminação na identificação das espécies, foram submetidos ao sequenciamento do 16S rRNA, conforme esquematizado na figura 6.

Figura 6- Fluxo de identificação dos microrganismos anaeróbios. ANC (Vitek 2), MALDI-TOF (Vitek MS).

Como controle de qualidade foram utilizadas cepas ATCCs de *Clostridium septicum* 12464 e *Bacteroides ovatus* 1304 para ambas as metodologias e a ATCC de *Escherichia coli* 8739 para a calibração do sistema VITEK MS e qualificação dos spots bacterianos.

4.6 Metodologia molecular de sequenciamento do 16S rRNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir da cultura do microrganismo em agar sangue anaeróbico (Columbia Blood Agar Base Oxoid, Basingstoke, England), utilizando o kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen). A reação de PCR utilizou primers específicos para a região do 16S rRNA, Fw: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG e Rv: ACGGCTACCTTGTTACGACTT, previamente descritos (Invitrogen; Mendes *et al.*, 2005). Os produtos obtidos pela PCR, de aproximadamente 1480 pb, foram purificados utilizando o Kit (Promega).

A reação de sequenciamento foi preparada utilizando BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e sequenciadas em ABI Prism 3130® (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas utilizando as ferramentas do DNASTar Software e comparadas com o banco de dados do GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

Foram considerados como resultados definitivos aqueles que obtiveram 100% de cobertura com as sequências de referência.

4.8. Avaliação do impacto econômico das metodologias propostas

Relacionamos os custos diretos dos insumos envolvidos na fase analítica da CANA conforme o procedimento operacional padrão adotado no HCFMUSP, descrito no anexo I e ilustrado na figura 7, com o CT e o CTM e utilizando o ANC (Vitek 2) e MALDI-TOF (Vitek MS). A descrição dos itens avaliados e seus respectivos preços encontram-se no anexo II. Não foram incluídos nessa análise, os equipamentos utilizados.

Os insumos adquiridos pelo HCFMUSP seguem as diretrizes da lei nº 10.520 de 17 de julho de 2002 que estabelece para a aquisição de bens e serviços comuns, a modalidade de licitação denominada pregão. Os valores dos insumos foram obtidos através das notas fiscais emitidas pelos fornecedores no ano de 2017 e definido o custo de uma CANA negativa, da cultura falso positiva para anaeróbios e da CANA positiva com a identificação de um microrganismo.

Figura 7- Fluxograma Vigente da Cultura de Anaeróbios no Laboratório de Microbiologia DLC- HCFMUSP. 1. Caldo Thioglicolato; 2. Incubação em estufa de CO₂; 3. Agar chocolate; 4. Agar sangue anaeróbio; 5. Exame bacterioscópico; 6. ANC (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

5. RESULTADOS

5.1 Composição e Avaliação do CT Modificado (CTM)

O CTM (Figura 8) foi composto por: amicacina, gentamicina e aztreonam, uma vez que esses antibióticos não interferiram no crescimento das 15 cepas de anaeróbios testadas; os resultados encontrados podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação do crescimento dos anaeróbios em tubos com CT e CT com diferentes antibióticos (n=15)

Nº	Microrganismo	Caldo Thioglicolato acrescido de antibióticos									
		CAZ	CRO	CEF	GE	AMI	CIP	LEV	AZT	CP	CN
1	<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC
2	<i>Bacteroides ovatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC
3	<i>Bacteroides vulgatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC
4	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC
5	<i>Parabacteroides distasonis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC
6	<i>Prevotella intermedia</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	SC
7	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	SC
8	<i>Parvimonas micra</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	SC
9	<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	SC
10	<i>Finegoldia magna</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	SC
11	<i>Clostridium perfringens</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	SC
12	<i>Clostridium clostridiiforme</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	SC
13	<i>Clostridium septicum</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	SC
14	<i>Clostridium sporogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC
15	<i>Bifidobacterium sp</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	SC
CQ	<i>C. septicum</i> ATCC 12464	+	-	+	+	+	-	-	+	+	SC
CQ	<i>B. ovatus</i> ATCC 1304	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC

CAZ: ceftazidima; **CRO:** ceftriaxona; **CEF:** cefepima; **GEN:** gentamicina; **AMI:** amicacina; **CIP:** ciprofloxacina; **LEV:** levofloxacina; **AZT:** aztreonam. **CP:** Controle positivo. **CN:** Controle negativo; **+**: Crescimento do anaeróbio; **-**: inibição do anaeróbio; **SC:** sem crescimento bacteriano

Caldo Thioglicolato Modificado – HCFMUSP

Amicacina 30 µg/mL, Gentamicina 10 µg/mL e
Aztreonam 30 µg/mL.

Figura 8- Caldo Thioglicolato Modificado HCFMUSP (CTM= CT + ATBs).

Durante o período de estudo, recebemos 160 amostras enviadas para realização de CANA que foram triadas em paralelo com CT e CTM, uma amostra foi excluída (duplicada).

Utilizando o CT como triagem para CANA, foram obtidas 51 (32%) amostras límpidas e 108 (68%) turvas, das amostras turvas, 97 foram negativas para anaeróbios e 11 positivas.

Com o CTM encontramos 79 (50%) amostras límpidas e 80 (50%) turvas, das amostras turvas, 69 foram negativas para anaeróbios e 11 positivas.

A triagem de CANA com o CT apresentou 61% (97) falsos positivos e com o CTM 43% (69) conforme esquematizado na Figura 9.

O CT e o CTM apresentaram sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%, já o valor preditivo positivo foi de 10% com o CT e 13% com o CTM. A especificidade para CANA foi de 34% com o CT e 53% com o CTM.

Figura 9- Aspecto macroscópico das amostras. CT: Caldo Thioglicolato; CTM: Caldo Thioglicolato Modificado.

Em relação as amostras positivas para anaeróbios não houve diferença no isolamento dos microrganismos com a recuperação de 17 espécies sendo 59% (10) pertencentes ao grupo *Bacteroides fragilis*, 18% (3) *Finegoldia magna*, 12% (2) *Prevotella* sp e *Clostridium* sp e 6% (1) *Peptoniphylus asaccharolyticus*.

As amostras triadas com CTM apresentaram uma melhor visualização, nos meios sólidos, das colônias de anaeróbios eliminando uma etapa extra de reisolamento permitindo a liberação do resultado final positivo 48 horas antes das amostras triadas pelo CT (Tabela 3).

Em 18% (28) das amostras analisadas, o CTM permitiu a liberação das culturas finais negativas 7 dias à frente do CT.

O teste estatístico utilizado demonstrou que o CTM apresentou uma diferença significativa sendo o valor de Chi quadrado= 26,036 com 1 grau de liberdade e o valor de $p < 0,05$.

O CTM apresentou crescimento aeróbico em 37 amostras sendo que 32% (12) eram enterobactérias, 22% (8) não fermentadores, 19% (7) *Staphylococcus* spp., 13% (5) *Enterococcus* spp., 11% (4) *Streptococcus* spp. e 3% (1) *Candida* spp.

Tabela 2 – Resultados da triagem das culturas anaeróbias utilizando o CT e o CTM (n=159).

	CT (n)	CTM (n)	CT - CTM (n)
Amostras límpidas	51	79	28
Amostras turvas	108	80	
Amostras falso positivas para anaeróbios	97	69	
CANA negativa	148	148	Não se aplica
CANA positiva	11	11	Não se aplica

CT: Caldo Thioglicolato; CTM: Caldo Thioglicolato Modificado (CT + amica+ genta+ aztreonam);
CANA: Cultura de anaeróbios.

Tabela 3: Avaliação do TAT de Liberação Final das Culturas de Anaeróbios (n=159).

CANA	CT (n)	CTM (n)
Negativas liberadas em 7 dias	51	79
Negativas liberadas em 14 dias	97	69
Positivas liberadas em 12 dias	0	11
Positivas liberadas em 14 dias	11	0

CT: Caldo Thioglicolato; CTM: Caldo Thioglicolato Modificado

5.2 Avaliação do ANC (Vitek 2- *bioMérieux, France*) e MALDI –TOF (Vitek MS - *bioMérieux, France*)

A performance do ANC (Vitek 2) e do MALDI-TOF (Vitek MS) para a identificação dos microrganismos anaeróbios podem ser vistas na tabela 4.

Tabela 4 – Performance do ANC (Vitek 2) e MALDI- TOF (Vitek MS) para a identificação dos 421 anaeróbios isolados

Organismos	Quantidade de isolados (n)	Nº (%) de isolados identificados por									
		Vitek 2 ANC Card					Vitek MS				
		Identificações		Baixa Discriminação da Espécie	Não Identificado	Erro de Identificação da Espécie	Identificações		Baixa Discriminação da Espécie	Não Identificado	Erro de Identificação da Espécie
Gênero	Espécie	Gênero	Espécie								
Bacteroides fragilis	113	113	113	0	0	0	113	109	4	0	0
Bacteroides caccae	7	7	3	4	0	0	7	3		0	0
Bacteroides thetaiotaomicron	45	45	42		0	0	45	45	0	0	0
Bacteroides ovatus	35	35	35	0	0	0	35	35	0	0	0
Bacteroides uniformes	7	7	7	0	0	0	7	7	0	0	0
Bacteroides vulgatus	4	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0
Parabacteroides distasonis	12	12	12	0	0	0	12	12	0	0	0
Fusobacterium nucleatum	21	17	17	0	4	0	21	21	0	0	0
Fusobacterium mortiferum	3	1	1	0	2	0	3	3	0	0	0
Fusobacterium necroforum	5	4	4	0	1	0	5	5	0	0	0
Fusobacterium varium	2	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0
Prevotella bivia	9	9	9	0	0	0	9	9	0	0	0
Prevotella buccae	6	6	6	0	0	0	6	6	0	0	0
Prevotella denticola	5	5	5	0	0	0	5	5	0	0	0
Prevotella intermedia	2	1	1	0	1	0	2	2	0	0	0
Prevotella melaninogenica	7	7	6	1	0	0	7	7	0	0	0
Prevotella oralis	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0
Actinomyces viscosus	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
Clostridium clostridioforme	11	11	9	0	0	2	11	11	0	0	0
Clostridium difficile	2	1	1	0	1	0	2	2	0	0	0
Clostridium ramosum	7	7	5	0	0	0	7	7	0	0	0
Clostridium septicum	2	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0
Clostridium sordellii	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Clostridium sporogenes	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Clostridium subterminale	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
Clostridium innocum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Clostridium tertium	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Clostridium perfringens	19	19	19	0	0	0	19	19	0	0	0
Eubacterium lentum	3	3	2	0	1	0	3	3	0	0	0
Propionibacterium acnes	19	19	19	0	0	0	19	19	0	0	0
Finegoldia magna	14	14	14	0	0	0	14	14	0	0	0
Helcococcus kunzii	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
Parvimonas micra	7	5	5	0	2	0	7	7	0	0	0
Peptoniphilus asaccharolyticus	9	9	9	0	0	0	9	9	0	0	0
Peptostreptococcus anaerobius	16	16	16	0	0	0	16	16	0	0	0
Veionella parvulla	23	2	2	0	21	0	23	23	0	0	0
Total acumulativo (%)	421	386 (92)	373 (89)	6 (1)	35 (8)	3 (1%)	420 (100)	412 (98)	4 (1)	1 (0)	0

Dos 421 isolados, 35 cepas não foram identificadas pelo ANC (Vitek 2) uma vez que não foi possível a obtenção do inóculo padronizado para essa metodologia (2,70 a 3,30 McFarland) e somente um isolado ficou sem identificação pelo MALDI-TOF (Vitek MS).

Das 386 cepas que foram identificadas pelas duas metodologias a concordância de gênero e espécie foi observada em 97% (373).

Em treze (3%) isolados houve concordância de gênero e discordância ou baixa discriminação da espécie. Estas cepas foram então submetidas ao sequenciamento do 16S e a concordância foi de 70% com o ANC (Vitek 2) e 92% com MALDI-TOF (Vitek MS) conforme descrito na Tabela 5.

O MALDI-TOF (Vitek MS) permitiu a liberação final da cultura positiva 5 dias à frente do ANC (Vitek 2), uma vez que tempo médio para obtenção do inóculo necessário para a realização do ANC (Vitek 2) foi de sete dias e para o MALDI-TOF (Vitek MS) 48 horas.

Tabela 5 – Resultados discrepantes ou com baixa discriminação das espécies obtidas com ANC (Vitek 2) e MALDI-TOF (Vitek MS), submetidas ao sequenciamento de 16S rRNA.

Quantidade de isolados	Microrganismos identificados	Identificação	
		ANC (Vitek 2)	MALDI-TOF (Vitek MS)
(n=13)	por Sequenciamento 16S		
1	<i>Prevotella bivia</i>	<i>Prevotella oralis</i>	<i>Prevotella bivia</i>
2	<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Clostridium clostridiiforme</i>	<i>Clostridium ramosum</i>
4	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B.fragilis</i> / <i>B.caccae</i>
4	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>B.thetaiotaomicron</i> / <i>B.caccae</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
1	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>P.oralis</i> / <i>P.melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
1	<i>Clostridium innocum</i>	<i>C.sporogenes</i> / <i>C.subterminale</i>	Sem identificação

5.3 Verificação do impacto econômico das metodologias propostas

- **Caldo Thioglicolato Modificado**

O desempenho do CTM na rotina laboratorial do HCFMUSP mostrou que este meio foi capaz de reduzir a quantidade de CANA falsos positivos em 18% sem interferir na recuperação dos anaeróbios.

O levantamento realizado mostrou que uma cultura positiva custa R\$ 130,00, uma cultura falso positiva para anaeróbios R\$ 80,00 e uma cultura negativa cerca de R\$ 40,00.

O CTM teve um custo adicional de R\$ 2,00 em relação ao CT, no entanto, esse meio gerou uma economia de R\$ 2.240,00 uma vez que o valor gasto com as culturas falso positivas utilizando o CT (97/159) foi de R\$ 7.760,00 e com o CTM (69/159) R\$ 5.520,00.

Extrapolando os percentuais de CANA negativas e falsas positivas encontrados na rotina de CANA do HCFMUSP em 2017, onde encontramos 11.017 amostras negativas podemos projetar que utilizando o CT teríamos 3.525 amostras negativas e 6.720 amostras falso positivas e com o CTM teríamos 5.508 amostras negativas e 4.737 amostras falso positivas. Utilizando o CT o valor anual gasto com essas amostras seria o equivalente a R\$ 548.530,00, já com o CTM R\$ 415.970,00 evidenciando que a utilização desse CTM em nossa rotina poderia levar a uma economia de R\$ 132.560,00 /ano (Figura 10).

Figura 10- Projeção da utilização de recursos gastos anualmente com as culturas negativas para microrganismos anaeróbios utilizando o CT e CTM. CT: Caldo Thioglicolato; CTM: Caldo Thioglicolato Modificado.

- **MALDI-TOF (Vitek MS)**

O levantamento dos insumos utilizando o ANC (Vitek 2) revelou que o custo de uma identificação, a partir da colônia isolada é de R\$ 20,00 uma vez que essa metodologia requer além do cartão ANC, um teste adicional de aerotolerância e um exame bacterioscópico cujo os resultados precisam ser informados pelo microbiologista para que o equipamento conclua a análise e libere a identificação da bactéria.

O custo da identificação através do MALDI-TOF é de R\$ 1,50 que representa 92,5% do valor gasto com o ANC (R\$ 20,00).

Em 2017, 7% (734) das amostras enviadas para CANA foram positivas, aplicando os resultados encontrados nesse estudo, podemos projetar que utilizando o MALDI-TOF (Vitek MS) o valor gasto com essas amostras seria o equivalente a R\$ 1.101, já com o ANC (Vitek 2) R\$ 14.680,00 evidenciando que a utilização dessa metodologia em nossa rotina pode levar a uma economia de 13.579,00 mil reais/ano que representa 93% a menos do valor Vitek ANC. (Figura 11).

Figura 11- Projeção da utilização de recursos gastos anualmente com as culturas positivas para microrganismos anaeróbios utilizando o ANC (Vitek 2) e MALDI TOF (Vitek MS).

6. DISCUSSÃO

Os microrganismos anaeróbios são intimamente relacionados com a microbiota humana e responsáveis por infecções endógenas e mistas (aeróbia/anaeróbia) em mais de 80% dos casos, o que exige diversas etapas de isolamento para posterior identificação, fazendo com que o TAT desse exame leve de 7 a 14 dias deixando muitas vezes de agregar valor à conduta terapêutica. No entanto, a importância da identificação desses microrganismos vem se consolidando cada vez mais com a comprovação de seu papel como importantes patógenos. As bactérias anaeróbias produzem enzimas e toxinas letais, promovem processos invasivos e agressivos e estão relacionadas a origem de diversos tipos de câncer; alguns estudos têm demonstrado uma maior concentração de *Fusobacterium nucleatum* em adenomas e carcinomas quando comparados com tecidos adjacentes normais e sugerem que esse microrganismo esteja relacionado à evolução dessa patologia podendo inclusive ser utilizado futuramente como um biomarcador de prognóstico (Brook, 2010; Keku *et al.*, 2013; García- Sánchez, 2013; Mima *et al.*, 2015; Viljoen *et al.*, 2015).

A cultura de anaeróbios ainda é um desafio para os laboratórios de rotina de microbiologia clínica que acabam adotando diferentes estratégias baseadas nos recursos disponíveis, nas restrições orçamentárias e necessidades clínicas, uma vez que essas bactérias necessitam de procedimentos laboriosos e específicos aliados a um conhecimento técnico especializado (Rodríguez-Cavallini *et al.*, 2011; Brook I, 2010).

No Brasil há uma dificuldade de aquisição de meios comerciais pré reduzidos, seletivos e diferenciais específicos para CANA como o agar PEA (álcool feniletílico) que dificulta o crescimento de alguns bacilos aeróbios Gram negativos, inibindo, por exemplo, a formação do véu do *Proteus* spp., o agar BBE (*Bacteroides bile esculina*) específico para o grupo *Bacteroides fragilis*, o agar sangue com kanamicina e vancomicina (KVLB) para o isolamento dos bacilos Gram negativos anaeróbios, entre outros. Um dos poucos meios disponíveis para CANA é o agar sangue anaeróbio, um meio enriquecido com hemina e vitamina K que favorece o crescimento de todos os microrganismos presentes na amostra, dificultando o reconhecimento das bactérias anaeróbias (Jousimies-Somer *et al.*, 2002; ANVISA 2007; Church D, 2016). Comercialmente, temos disponível também, o agar sangue anaeróbio com amicacina, no entanto, em nossa prática não observamos vantagens em relação ao custo benefício que justifique sua utilização, uma vez que além de ser mais caro, a inibição dos microrganismos aeróbios foi raramente comprovada na rotina de CANA do HCFMUSP além de não proporcionar uma melhor visualização dos anaeróbios.

O crescimento nos meios sólidos das bactérias aeróbias presentes nas culturas mistas é o grande obstáculo da CANA e a elaboração de estratégias para enfrentar esse problema é fundamental para os laboratórios clínicos de rotina.

No HCFMUSP o caldo de Thioglicolato (CT) é utilizado para recuperação e triagem dos anaeróbios, porém sua especificidade para CANA é baixa (Church D, 2016). Com o intuito de aumentar a especificidade da triagem de anaeróbios, elaboramos o CTM (caldo Thioglicolato acrescido de amicacina,

gentamicina e aztreonam). Essa composição, é inédita na literatura, e repercutiu diretamente na redução do “workload” da CANA, pois proporcionou em diversas etapas do processo um melhor aproveitamento dos recursos.

O desempenho do CTM na rotina laboratorial do HCFMUSP mostrou que este meio foi capaz de reduzir a quantidade de falsos positivos em 18% sem interferir na recuperação dos anaeróbios. Um achado relevante, tendo em vista que o Sistema Único de Saúde paga por uma cultura de anaeróbios R\$ 10,25 segundo o SIGTAP (Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS- competência Março/2018), um valor quatro vezes menor do que o custo de uma cultura negativa e treze vezes inferior a uma cultura positiva segundo os dados encontrados no levantamento apresentado nesse estudo (SIGTAP- DATASUS- competência 03/2018).

Além disso, o CTM reduziu o TAT dos resultados negativos em sete dias, fator que pode contribuir com o “stewardship” pela redução da administração de antibióticos com ampla cobertura podendo diminuir a pressão seletiva dessas drogas. Observamos também uma diminuição no TAT do resultado positivo pela melhor visualização da cepa de anaeróbios em meios sólidos diminuindo a necessidade das diversas etapas de isolamentos, utilizando menos insumos e promovendo uma consequente redução dos custos diretos da CANA.

A concentração final de amicacina, gentamicina e aztreonam no CTM foi respectivamente 3µg/mL, 1 µg/mL e 3µg/mL, esse meio possui mais da metade da concentração de amicacina encontrada nos meios sólidos comerciais (1µg/mL) e é ainda suplementado com aztreonam e gentamicina (Bula do produto com registro na ANVISA/MS:80035670006). Apesar dessa

concentração superior, o CTM não inibiu alguns aeróbios e o perfil de resistência das bactérias isoladas no HCFMUSP pode justificar esses achados, futuramente novas combinações de antibióticos serão testadas. A performance do CTM foi estatisticamente significativa e sua aplicação é factível para os laboratórios de rotina, uma vez que seu uso é prático, de baixo custo e com um grande fator de impacto econômico, podendo proporcionar uma economia de R\$ 132.560,00 /ano.

Estudos realizados com MALDI-TOF MS demonstram que esta metodologia é superior aos métodos de identificação convencionais, no entanto grupos menos estudados como os anaeróbios apresentam resultados mais heterogeneos (La Scola *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2013; Garner *et al.*, 2014).

Os dados apresentados nesse estudo, mostraram que a concordância de gênero e espécie entre o ANC (Vitek 2) e o MALDI-TOF (Vitek MS) foi observada em 97% das 386 cepas identificadas. Das treze (3%) cepas que apresentaram resultados discordantes ou baixa discriminação da espécie, o sequenciamento 16S demonstrou uma concordância maior com o MALDI-TOF (Vitek MS) 92 %.

O MALDI-TOF (Vitek MS) permitiu a identificação de 35 cepas que não foram identificadas pelo ANC (Vitek 2) e somente um isolado de *Clostridium innocum* ficou sem identificação pelo MALDI-TOF (Vitek MS). Para esse isolado, o ANC (Vitek 2) encontrou uma baixa discriminação entre *Clostridium subterminale* e *C.sporogenes*. Em ambas metodologias, a composição da base de dados para *Clostridium spp.* foi composta principalmente por Grosse-Herrenthey *et al* e alguns estudos mostram boa identificação para este gênero, no entanto o banco de dados AES (ANC card), MYLA e SARAMIS (MALDI-

TOF MS database 2.0) não contemplam *C.innocum* justificando o insucesso na identificação deste isolado, que apesar da baixa patogenicidade e incapacidade de produzir toxinas, apresenta resistência intrínseca a vancomicina e causa graves infecções em pacientes imunocomprometidos (David *et al.*,2004; Chia *et al.*, 2017).

Os resultados encontrados em nosso estudo, estão de acordo com outros estudos envolvendo a identificação de bactérias anaeróbias utilizando o MALDI- TOF MS. Yang Li *et al.* analisaram o desempenho do MALDI-TOF (Vitek MS database 2.0) frente ao ANC (Vitek 2) e concluíram que a concordância de gênero e espécie das 50 cepas testadas foi de 86% revelando que o MALDI-TOF (Vitek MS) foi superior para a determinação das espécies, identificando 92% delas. Lee *et al.* analisando o desempenho do MALDI-TOF (Vitek MS) e dos métodos convencionais API Rapid ID 32 A e ANC (Vitek 2) frente ao sequenciamento 16S para identificação de 274 anaeróbios verificaram que o MALDI-TOF (Vitek MS – database 1.1) identificou corretamente 83,9% (209) com um desempenho de 100% para *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Clostridium perfringens*, não identificando seis das 26 cepas de *Eggerthella lenta* e quatro de nove cepas de *Peptoniphylus asaccharolyticus*. O MALDI-TOF (Vitek MS) permitiu 36% de identificações adicionais em comparação com as metodologias convencionais que identificaram somente o gênero, identificaram erroneamente ou não identificaram os microrganismos dos quais 26% eram *Veionella parvulla*. 25 isolados não estavam presentes no banco de dados do Vitek MS e não puderam ser identificados pela espectrometria de massas (Lee *et al.*,2015).

Garner *et al* encontraram 91,2% de identificações corretas (gênero e espécie) avaliando 651 anaeróbios submetidos a identificação pelo sequenciamento 16S e por MALDI-TOF (Vitek MS - database 2.0) que apresentou um ótimo desempenho na identificação de *Bacteroides fragilis* e uma maior dificuldade na identificação das espécies de *Fusobacterium spp* e *Propionibacterium spp* (Garner *et al.*,2013).

Um estudo de La Scola *et al* analisou a identificação de 544 anaeróbios isolados de amostras clínicas utilizando o MALDI-TOF (Bruker Biotyper – Becton Dickinson) e o sequenciamento 16S demonstrando que o MALDI-TOF identificou corretamente 61% das cepas, 100% dos *Bacteroides spp.* e *Clostridium perfringens*, mas somente 50% das cepas de *Finnegoldia magna*, *Fusobacterium spp.* e *Prevotella spp.*. Justen *et al* avaliaram o MALDI-TOF Bruker Biotyper e Vitek MS (database 2.0) para a identificação de microrganismos anaeróbios revelando que essas metodologias foram capazes de identificar corretamente 67,2% e 49,0% dos 290 isolados, respectivamente. Martiny *et al* relataram um melhor desempenho na identificação das espécies com o Vitek MS (database 2.0) 75,3% em relação ao sistema Bruker 61,6% analisando 73 bactérias anaeróbias (La Scola *et al.*,2011; Justesen *et al.*,2011).

Muitos autores acreditam que essas diferenças percentuais reflitam a qualidade e quantidade do inóculo bacteriano uma vez que as porcentagens mais baixas de identificação estão relacionadas a estirpes mais fastidiosas (La Scola *et al.*, 2011; Garner *et al.*,2014).

O ponto em comum evidenciado em todos os estudos citados, é que o MALDI-TOF permite a identificação direta da primeira placa confeccionada sem a necessidade de reisolamentos, uma vez que necessita de poucas colônias

para análise microbiológica, neutralizando um grande obstáculo da cultura de anaeróbios; o crescimento tardio e debilitado em meios sólidos. Essa característica é determinante para o diagnóstico microbiológico principalmente para anaeróbios fastidiosos que muitas vezes perdem sua viabilidade durante as etapas de isolamento impossibilitando a comprovação da etiologia anaerobia (La Scola *et al.*,2011; Justesen *et al.*,2011; Garner *et al.*,2014; Lee *et al.*,2015).

A acurácia na identificação do grupo *Bacteroides fragilis* também é constantemente comprovada e muito relevante, uma vez que a espectrometria de massas MALDI-TOF tem permitido inúmeras descobertas taxonômicas que associadas aos estudos moleculares vêm estabelecendo a patogenicidade dos microrganismos anaeróbios e cada vez mais evidenciando o grupo *B.fragilis* como o mais virulento, sua capsula polissacarídea é sabidamente relacionada à formação de abscessos, sendo também o microrganismo anaeróbio mais relacionado aos crescentes relatos de resistência antimicrobiana, inclusive a carbapenêmicos e ao metronidazol (Kierzkowska *et al.*, 2011; Sadarangani *et al.*,2014). Os dados encontrados em nosso estudo mostraram que o MALDI-TOF (Vitek MS) identificou corretamente 98,2% das cepas pertencentes ao grupo *Bacteroides fragilis*, essas espécies apresentam picos muito próximos o que pode justificar a baixa discriminação do espectro de massas gerado nos quatro isolados encontrados (Nagy *et al.*,2009; La Scola *et al.*,2011; Justesen *et al.*,2011).

O ANC (Vitek 2) tem desempenho satisfatório validado na literatura para a identificação da maioria dos anaeróbios de importância médica, no entanto pode apresentar dificuldades de identificação com as espécies que possuem

um perfil assacarolítico, como algumas cepas pertencentes ao gênero *Clostridium* spp (Renie *et al.*,2008).

Os resultados com baixa discriminação das espécies com o ANC (Vitek 2), encontrados nesse estudo, são esperados pelo fabricante que propõe o uso de provas adicionais como por exemplo a produção de lipase, lecitinase e indol para concluir a identificação, principalmente para *Prevotella* spp. e *Clostridium* spp., no entanto, essas provas necessitam de meios específicos como o agar EYA (Egg Yolk Agar), não disponível comercialmente no Brasil, e ainda alguns anaeróbios apresentam resultados variáveis ao teste de indol, como algumas espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, ou seja, mesmo que disponíveis, nem sempre essas provas adicionais são determinantes para a identificação bacteriana, como nos casos encontrados nessa amostragem (Mory *et al.*, 2009).

Vale a pena ressaltar que a qualidade e confiabilidade da identificação em ambas metodologias utilizadas, estão intimamente relacionadas com a disponibilidade de uma base de dados completa e atualizada. Com relação às metodologias convencionais, o MALDI-TOF (Vitek MS) oferece uma biblioteca aberta, isto é, com a possibilidade de inclusão de novos espectros que podem ampliar a base de dados possibilitando identificações futuras (Rennie *et al.*,2008; Justesen *et al.*, 2011; Vega-Castaño *et al.*,2012; Nagy *et al.*,2012). Esse estudo fornecerá uma contribuição importante com a inclusão da cepa de *Clostridium innocum* identificada somente pelo 16S na base de dados do Vitek MS.

As metodologias fenotípicas avaliadas demonstraram um ótimo desempenho, no entanto apresentam diferenças significativas em relação ao custo benefício (Rennie *et al.*,2008; Blairon., 2010; Li Y *et al.*,2014).

A introdução do sistema MALDI-TOF nos laboratórios de microbiologia é inicialmente cara , como a inclusão de qualquer outra plataforma diagnóstica, devido custo elevado do equipamento entre R\$ 600.000,00 a R\$ 800.000,00, no entanto, esse gasto é rapidamente compensado pelo uso descontinuado das metodologias tradicionais, pela redução do tempo de identificação bacteriana, pela melhora dos fluxos de trabalho e pelos benefícios gerado aos pacientes, como por exemplo, a redução da morbidade e mortalidade, relatada em diversos estudos, devido ao melhor gerenciamento da terapia antimicrobiana. Gailliot *et al* encontraram uma redução de custos em 89,3% com as identificações realizadas pelo laboratório durante o primeiro ano da implementação do MALDI-TOF e ainda uma importante redução (cerca de 32 vezes) dos resíduos gerados nesse período (Gailliot *et al.*,2011; de la Pedrosa *et al.*,2016; Ge *et al.*, 2016).

A análise do custo da identificação, a partir da colônia isolada em meio sólido realizada nesse estudo, revelou um valor de R\$ 1,50 utilizando o MALDI-TOF (Vitek MS) e de R\$ 20,00 com o ANC (Vitek 2) o que representa uma diferença de 92,5% nos custos diretos. Utilizando essa tecnologia, foi possível reduzir o TAT do resultado positivo em cinco dias uma vez que tempo médio para obtenção do inóculo necessário para a realização do ANC (Vitek 2) foi de sete dias e para o MALDI-TOF (Vitek MS) 48 horas e que o processo de identificação pelo ANC (Vitek 2) leva até 24 horas e da mesma cepa pelo MALDI-TOF (Vitek MS) 10 minutos.

O MALDI-TOF para a rotina de anaeróbios, apresenta uma grande vantagem frente aos métodos automatizados convencionais, uma vez que não necessita de grande quantidade de inóculo, e realiza a identificação pela análise proteômica independente das variantes fenotípicas como a expressão de características e *performance* frente às provas bioquímicas uma vez que essas bactérias são em sua maioria fastidiosas e assacarolíticas bioquimicamente (Rennie *et al.*, 2008; Nagy *et al.*, 2012). Para esses microrganismos, o reconhecimento das características morfotintórias (Gram) e morfológicas da colônia continuam sendo críticos para a correta e eficaz identificação, por isto o investimento e a formação de profissionais especializados devem avançar concomitantemente com as novas tecnologias.

7. CONCLUSÕES

A eluição dos discos de amicacina, gentamicina, e aztreonam permitiu a criação do CTM que apresentou uma especificidade 19% maior que o CT e reduziu significativamente a quantidade de triagem de CANA falso positiva de 61% para 43% ($p < 0,05$) sem interferir na recuperação dos anaeróbios. O CTM otimizou o TAT das CANA negativas e positivas apresentando uma redução de R\$ 2.240,00 na amostragem desse estudo.

Ambas metodologias de identificação avaliadas (ANC Vitek 2 e MALDI-TOF Vitek MS) apresentam resultados concordantes em 97% sendo que o MALDI-TOF (Vitek MS) permitiu a identificação adicional de 35 cepas e a redução do TAT positivo em cinco dias, com uma economia de R\$ 7.786,00.

A implementação do CTM na triagem das bactérias anaeróbias e a identificação pelo MALDI-TOF (Vitek MS) reduziram o “workload” da CANA, diminuíram o TAT e ainda promoveram uma economia dos recursos. Quando realizada uma projeção inferindo os dados obtidos nesse estudo nas estatísticas de CANA de 2017 do HC FMUSP a redução de custos com o CTM seria de R\$ 132.560,00/ano e de R\$ 13.579,00/ano com o MALDI-TOF.

ANEXOS

Anexo I - Descrição do fluxograma para cultura de anaeróbios adotado no Laboratório de Microbiologia DLC- HCFMUSP.

Anexo II - Descrição dos custos diretos utilizados na fase analítica da cultura de anaeróbios.

ANEXO I

1. Descrição do fluxograma para cultura de anaeróbios adotado no Laboratório de Microbiologia DLC- HCFMUSP

Conforme o fluxograma em exercício, as amostras devidamente coletadas, acondicionadas e transportadas são recepcionadas no Laboratório de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP pelo programa do sistema de gestão hospitalar (SIGH). Os materiais biológicos são inoculados em caldo Thioglicolato USP (Oxoid, Basingstoke, England), denominado CT, incubados em estufa (ar ambiente) e submetidos a uma triagem visual diária por até sete dias. Se após o período mencionado não for observada turvação do meio, a cultura é liberada como negativa. Quando verificada turvação, essa amostra é semeada em meios sólidos e submetida ao exame bacterioscópico. Esse exame pode sinalizar a presença de anaeróbios e permite a identificação presuntiva de algumas espécies que apresentam características morfo tintoriais específicas (Figura 12). No entanto, outros grupos como o *Bacteroides fragilis* não apresentam diferenças morfotintoriais em relação às enterobactérias, com as quais está comumente associado, impossibilitando que a avaliação quanto a presença ou ausência de anaeróbios seja sugerida somente pela leitura da lâmina (Kierzkowska *et al.*, 2011).

Figura 12- Características morfotintoriais visualizadas pela coloração de Gram específicas de: A) *Veionella parvulla*/ B) *Peptostreptococcus anaerobius*/C) *Actinomyces viscosus*/ D) *Fusobacterium nucleatum*/E) *Clostridium sporogenes*.
 FONTE:Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual(A,B e C) /JCM Catalogue of strains (D e E).

A semeadura em meios sólidos é realizada em ágar chocolate (COX) que é utilizado como teste de aerotolerância sendo incubado em aerobiose (estufa de CO₂), permitindo o crescimento de aeróbios fastidiosos e facultativos e em ágar sangue anaeróbio (Columbia Blood Agar Base Oxoid, Basingstoke, England) que é incubado em atmosfera de anaerobiose composta por jarra, indicador e gerador químico de capaz de reduzir a concentração de oxigênio a menos de 1% (Oxoid, Basingstoke, England). Após 48 horas, o crescimento bacteriano obtido nas duas atmosferas é comparado e correlacionado com o Gram levando as possíveis interpretações, conforme descrito na Figura 13.

Figura 13- Exemplo de Triagem do material originado do Caldo Thioglicolato Turvo.

A presença concomitante de anaeróbios e aeróbios é a situação mais comumente encontrada e nestes casos, outra etapa dentro da cultura de anaeróbios se torna necessária, o reisolamento, onde todas as colônias suspeitas, isto é, aquelas que apresentam características distintas e específicas de alguns anaeróbios (como por exemplo: a morfologia da colônia, aspecto e pigmento), aquelas não presentes no ágar chocolate ou que diferem das encontradas nele, são reisoladas em ágar sangue anaeróbio e um novo teste de aero tolerância em agar chocolate é realizado. (Figura 14)

Figura 14- Exemplo de Reisolamento das colônias suspeitas de anaeróbios 1. Agar sangue anaeróbico / 2. agar chocolate.

Da mesma maneira, o ágar chocolate é incubado em estufa de CO₂ e o ágar sangue anaeróbico sob atmosfera de anaerobiose por 48 horas. Quando verificado crescimento em aerobiose e a colônia envolvida não possuir características específicas de anaeróbios que podem apresentar teste de aero tolerância positivo (como por exemplo, *P.acnes* e algumas espécies de *Clostridium* spp.) a suspeita é descartada e a cultura liberada como negativa.

Quando o teste de aero tolerância é negativo (não há crescimento em aerobiose), trata-se de um anaeróbico (Figura 15) que na maioria das vezes necessita de um novo repique e consequentemente mais 48 horas para prosseguir o processo de identificação pelo sistema ANC (Vitek 2 - bioMérieux, France), descrito e detalhado em materiais e métodos.

**Aerobiose
Agar Chocolate**

**Anaerobiose
Agar Sangue Anaeróbico**

Interpretação

**Cultura para Anaeróbios
Negativa**

**Cultura para Anaeróbios
Positiva**

Figura 15- Exemplos do teste de aerotolerância das colônias suspeitas reisoladas.

ANEXO II

1. Descrição dos custos diretos utilizados na fase analítica da cultura de anaeróbios.

O preço dos insumos para a realização da cultura de anaeróbios e materiais utilizados nesse estudo podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6 – Custo direto dos insumos para a realização da CANA e utilizados no estudo.

Insumos		Semeadura inicial		Reisolamento	Identificação	
		CT	CTM		ANC (Vitek 2)	MALDI-TOF (Vitek MS)
		Valor (R\$)			Valor (R\$)	
Caldo Thioglicolato	1 tubo	3,10	3,10	-	-	-
Agar Chocolate	1 placa	1,90	1,90	1,90	1,90	-
Agar Sangue	1 placa	2,05	2,05	-	-	-
Agar Sangue Anaeróbio	1 placa	4,83	4,83	4,83	-	-
Lâmina	1 lâmina	0,07	0,07	-	0,07	-
Alça Descartável	1 alça	0,12	0,12	-	0,12	-
Swab	1 swab	-	-	-	0,18	-
Gerador de Anaerobiose	1 envelope	22,00	22,00	22,00	-	-
Indicador de Anaerobiose	1 envelope	8,45	8,45	8,45	-	-
Disco de Amicacina 30µg	1 disco	-	0,63	-	-	-
Disco de Aztreonam 30µg	1 disco	-	0,63	-	-	-
Disco de Gentamicina 10µg	1 disco	-	0,63	-	-	-
Cartão ANC (Vitek 2)	1 cartão	-	-	-	17,3	-
Slide MALDI TOF(Vitek MS)	1 spot	-	-	-	-	1,4
Matriz CHCA (Vitek MS)	1 µl	-	-	-	-	0,04
Palito Descartável	1 unidade	-	-	-	-	0,02
Total	-	42	44	37	20	1,5

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul; 27(3): 419-40.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – Inquérito Nacional de Laboratórios de Microbiologia de Hospitais com 10 ou mais leitos de UTI e Hospitais Sentinelas. Maio 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.

Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *JMed Microbiol*. 2012 Feb;61(Pt 2):169-79.

Bartlett JG. An update on mixed aerobic and anaerobic infections. *Adv Stud Med* 2002; (2):104-9.

Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods*. 2013 Jan;92(1):14-24.

Bharadwaj R. Anaerobic microbiology: time to rejuvenate. *Indian J Med Microbiol*. 2012; 30(1):3-5.

Blairon L, Maza ML, Wybo I, Piérard D, Dediste A, Vandenberg O. Vitek 2 ANC card versus BBL Crystal Anaerobe and RapID ANA II for identification of clinical anaerobic bacteria. *Anaerobe*. 2010 Aug;16(4):355-61.

Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS, Miranda KR, Guimarães PL, Santos-Filho J, Vieira JM, Barroso DE, Emond JP, Ferreira EO, Paula GR, Domingues RM. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe*. 2010 Jun; 16(3): 190-4.

Brook I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe*. 2010 Jun; 16(3):183-9.

Brook I. Infective endocarditis caused by anaerobic bacteria. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008 Oct; 101(10):665-76.

Cardoso JB. Gangrena de Fournier. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2007; 40 (4): 493-9.

Chia JH, Feng Y, Su LH, Wu TL, Chen CL, Liang YH, Chiu CH. *Clostridium innocuum* is a significant vancomycin-resistant pathogen for extraintestinal clostridial infection. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Aug; 23(8):560-566.

Church DL. Selected topics in anaerobic bacteriology. Microbiol Spectrum 2016 4 (4): DMIH2-0015-2015.

David V, Bozdogan B, Mainardi JL, Legrand R, Gutmann L, Leclercq R. Mechanism of intrinsic resistance to vancomycin in *Clostridium innocuum* NCIB 10674. J Bacteriol. 2004 Jun; 186(11):3415-22.

de la Pedrosa EG, Gimeno C, Soriano A, Cantón R. [Studies of the cost effectiveness of MALDI-TOF and clinical impact]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016 Jun; 34 Suppl 2:47-52.

Dubreuil L, Odou MF. Anaerobic bacteria and antibiotics: What kind of unexpected resistance could I find in my laboratory tomorrow? Anaerobe. 2010 Dec; 16(6):555-9.

Fedorko DP, Drake SK, Stock F, Murray PR. Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Sep; 31(9):2257-62.

Ferreira TG, Moura H, Barr JR, Pilotto Domingues RMC, Ferreira EO. Ribotypes associated with *Clostridium difficile* outbreaks in Brazil display distinct surface protein profiles. Anaerobe. 2017 Jun;45:120-128.

Fischer M, Bhatnagar J, Guarner J, Reagan S, Hacker JK, Van Meter SH, Poukens V, Whiteman DB, Iton A, Cheung M, Dassey DE, Shieh WJ, Zaki SR. Fatal toxic shock syndrome associated with *Clostridium sordellii* after medical abortion. N Engl J Med. 2005 Dec 1; 353(22):2352-60.

Gaillot O, Blondiaux N, Loïez C, Wallet F, Lemaître N, Herwegh S, Courcol RJ. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12):4412.

García-Sánchez JE, García-Sánchez E, Martín-Del-Rey Á, García-Merino E. Anaerobic bacteria 150 years after their discovery by Pasteur. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015 Feb; 33(2):119-28.

Garner O, Mochon A, Branda J, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro M, Ginocchio C, Jennemann R, Manji R, Procop GW, Richter S, Rychert J, Sercia L, Westblade L, Lewinski M. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr; 20(4):335-9.

Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, Lee MH, Wu TL, Chang SC, Lu JJ. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. J Microbiol Immunol Infect. 2017 Oct; 50(5):662-668.

Goldstein EJ, Citron DM, Goldman PJ, Goldman RJ. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. Anaerobe. 2008 Apr; 14(2):68-72.

Holdeman LV, Moore WE. Roll-tube techniques for anaerobic bacteria. Am J Clin Nutr. 1972 Dec; 25(12):1314-7.

Ignacio A, Fernandes MR, Avila-Campos MJ, Nakano V. Enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from fecal microbiota of children. Braz J Microbiol. 2015 Oct-Dec;46(4):1141-5.

Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron D, Baron E, Wexler H, Finegold S. Waddworth – KTL Anaerobic Bacteriology Manual 6a ed. 2002.

Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M, Skov MN, Gahrn-Hansen B, Møller JK. Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry systems. J Clin Microbiol. 2011 Dec; 49(12):4314-8

Kennedy CL, Krejany EO, Young LF, O'Connor JR, Awad MM, Boyd RL, Emmins JJ, Lyras D, Rood JI. The alpha-toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. Mol Microbiol. 2005 Sep; 57(5):1357-66.

Keku TO, McCoy AN, Azcarate-Peril AM. *Fusobacterium* spp. and colorectal cancer: cause or consequence? *Trends Microbiol.* 2013 Oct;21(10):506-8.

Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, Mlynarczyk A, Lodomirska Pestkowska K, Durlik M, Paczek L, Mlynarczyk G. Participation of strictly anaerobic bacteria in infections among hospitalized transplant patients in a clinical hospital in Warsaw. *Transplant Proc.* 2011 Oct; 43(8):3130-1.

Kushawaha A, Popalzai M, El-Charabaty E, Mobarakai N. Lemierre's syndrome, reemergence of a forgotten disease: a case report. *Cases J.* 2009 Mar 10; (2) 63-97.

La Scola B, Fournier PE, Raoult D. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe.* 2011 Jun;17(3):106-12.

Lee W, Kim M, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS), a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS system for identification of anaerobic bacteria. *Ann Lab Med.* 2015 Jan;35(1):69-75.

Li Y, Gu B, Liu G, Xia W, Fan K, Mei Y, Huang P, Pan S. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis.* 2014 May; 6(5):517-23.

Margaret E, et al. *The Recognition of Anaerobic Growth and the Development of the Anaerobic Jar*. Clinical Microbiology Proficiency Testing. 2003.

Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol. 2007 Feb; 45(2):544-7.

Miller PH, Wiggs LS, Miller JM. Evaluation of AnaeroGen system for growth of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 1995 Sep; 33(9): 2388-91.

Mikamo H, et al. Clinical characteristics associated with mortality of patients with anaerobic bacteremia. Anaerobe 2016 Jun; 39:45-50.

Mima K, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. Gut 2015; Aug 26.

Mory F, Alauzet C, Matuszeswski C, Riegel P, Lozniewski A. Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of medically relevant anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 2009 Jun; 47(6):1923-6.

Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, Urbán E. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. J Med Microbiol. 2012 Oct; (61):1393-400.

Nakano V, Nascimento e Silva Ad, Merino VR, Wexler HM, Avila-Campos MJ. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. Clinics (Sao Paulo). 2011; 66(4):543-7.

Nanjappa S, Shah S, Pabbathi S. *Clostridium septicum* Gas Gangrene in Colon Cancer: Importance of Early Diagnosis. Case Rep Infect Dis. 2015; (69): 42-47.

Papaparaskevas J, Katsandri A, Pantazatou A, Stefanou I, Avlami A, Legakis NJ, Tsakris A. Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: a prospective observational study. Anaerobe. 2011 Jun; 17(3):113-7.

Park Y, Choi JY, Yong D, Lee K, Kim JM. Clinical features and prognostic factors of anaerobic infections: a 7-year retrospective study. Korean J Intern Med. 2009 Mar; 24(1):13-8.

Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chem. 2015 Jan; 61(1):100-11.

Ramana KV. Clinical Microbiology: Reemphasizing the Role of Anaerobic Bacteria in Human Infections. J Med Microb Diagn (1): e109.

Rennie RP, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB, Mirrett S, Janda W, Ristow K, Krilich A. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. J Clin Microbiol. 2008 Aug; 46(8):2646-51.

Robertson KP, Smith CJ, Gough AM, Rocha ER. Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. *Infect Immun*. 2006 Apr; 74(4):2304-16.

Rodrigues R C. Gestão de Custos em Laboratórios Públicos. Laboratórios Centrais de Saúde Pública - Curitiba (Lacen). 2014.

Rodríguez-Cavallini E, Vargas P, Rodríguez C, Quesada-Gómez C, Gamboa-Coronado MM. Phenotypic identification of over 1000 isolates of anaerobic bacteria recovered between 1999 and 2008 in a major Costa Rican hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jul; 17(7):1043-7.

Roe DE, Finegold SM, Citron DM, Goldstein EJ, Wexler HM, Rosenblatt JE, Cox ME, Jenkins SG, Hecht DW. Multilaboratory comparison of growth characteristics for anaerobes, using 5 different agar media. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep 1; 35(Suppl1):S36-9.

Rolfe RD, Hentges DJ, Campbell BJ, Barrett JT. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1978 Aug;36(2):306-13.

Rosenblatt JE, Fallon A, Finegold SM. Comparison of methods for isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. *Appl Microbiol*. 1973 Jan; 25(1): 77-85.

Samant JS, Peacock JE Jr. *Fusobacterium necrophorum* endocarditis Case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Feb; 69(2):192-5.

Sadarangani SP, Cunningham SA, Jeraldo PR, Wilson JW, Khare R, Patel R. Metronidazole- and carbapenem-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated in Rochester, Minnesota, in 2014. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul; 59(7):4157-61.

Shahin M, Jamal W, Verghese T, Rotimi VO. Comparative evaluation of anoxomat and conventional anaerobic GasPak jar systems for the isolation of anaerobic bacteria. *Med Princ Pract*. 2003 Apr-Jun; 12(2):81-6.

Sistema de gerenciamento da tabela de procedimentos, medicamentos e OPM do SUS (SIGTAP-DATASUS) competência Março de 2018. Disponível em: <http://sigtap.datasus.gov.br>

Sonnenwirth AC. Evolution of anaerobic methodology. *Am J Clin Nutr*. 1972 Dec; 25(12):1295-8.

Summanen PH, McTeague M, Väisänen ML, Strong CA, Finegold SM. Comparison of recovery of anaerobic bacteria using the Anoxomat, anaerobic chamber, and GasPak jar systems. *Anaerobe*. 1999 Feb; 5(1):5-9.

Tickler IA, Goering RV, Whitmore JD, Lynn AN, Persing DH, Tenover FC; Healthcare Associated Infection Consortium. Strain types and antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul; 58(7):4214-8.

Veloo AC, Welling GW, Degener JE. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. Anaerobe. 2011 Aug; 17(4):211-2.

Vega-Castaño S, Ferreira L, González-Ávila M, Sánchez-Juanes F, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Reliability of MALDI-TOF mass spectrometry in the identification of anaerobic bacteria. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012 Dec; 30(10):597-601.

Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D. Manual of Clinical Microbiology. 10a ed. 2012.

Viljoen KS, Dakshinamurthy A, Goldberg P, Blackburn JM. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between fusobacterium spp., enterotoxigenic Bacteroides fragilis (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. PLoS One. 2015 Mar 9;10(3):e0119462.

Walter G, Vernier M, Pinelli PO, Million M, Coulange M, Seng P, Stein A. Bone and joint infections due to anaerobic bacteria: an analysis of 61 cases and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Aug; 33(8):1355-64.

Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007 Oct; 20(4):593-621.