View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Repositório da Universidade Nova de Lisboa

Elementos bibliográficos resultantes desta dissertação

Foi submetido o resumo:

Carvalho, F., M.J. Chasqueira, E. Gonçalves, e P. Paixão**. Deteção de *Bacteroides* spp. e *Prevotella* spp. em amostras clínicas por PCR em tempo real**. VI Congresso Científico da Associação Nacional dos Laboratórios Clínicos / IV Jornadas Internacionais de Qualificação de Análises Clínicas, Lisboa. 20-21 Maio 2016.

Agradecimentos

A realização desta tese de mestrado foi, não só um desafio profissional como também se acabou por revelar pessoal. A conclusão deste trabalho foi possível graças ao contributo, direto ou indireto, de várias pessoas às quais gostaria de agradecer:

Em primeiro lugar ao Professor Doutor Paulo Paixão pela oportunidade em poder realizar esta tese, em aprofundar os meus conhecimentos na área, pela confiança e otimismo em cada fase deste percurso;

À co-orientadora, Mestre Mª de Jesus Chasqueira por todos os esclarecimentos, paciência, apoio quando o desânimo parecia querer romper, e pelas sugestões na fase final desta caminhada;

À Dra. Elsa Gonçalves por toda a ajuda prestada, que foi imprescindível à realização desta tese, pela disponibilidade que sempre demonstrou mesmo quando não se encontrava presente;

Aos meus Pais, que SEMPRE fizerem TUDO o que lhes era possível;

A todos os amigos, que durante este percurso, tiraram um pouco do seu tempo para me apoiar e dizer que era possível… à Nídia que é e sempre será, à Marta L. que aguentou a minha ausência quando mais precisava da presença, à Dinha por todo o apoio e material académico, à Marta N. pelo abanão para a realidade, que na reta final era mais que necessário;

À Malta da FCM: Catarina, Joana, Cate e Fábinho. Por todas as gargalhadas, por todos os jantares, almoços, gelados e jogos. Pelas discussões, apoio e compreensão… abrilhantaram este último ano. Estamos JUNTOS;

Ao *Business group*, Vera, Tânia e Jorge. Por todos os momentos passados juntos, desde o estudo às saídas, que fizeram com que iniciar o mestrado fosse muito mais divertido;

Por fim, mas nada menos importante, ao João. Podes não ter começado esta etapa comigo mas sem dúvida que a terminaste. Obrigada por todo o teu apoio em tudo o que te era possível, pela amizade, pelo companheirismo e por fazeres tudo para que, dentro do desconforto, estivesse confortável… Obrigada por insistires, persistires e não desistires.

Dedico esta dissertação a mim, aos que me apoiaram e aos que fizeram com que esta etapa da vida fosse mais uma daquelas que fica para sempre gravada na memória. Aos que se revelaram…

If you are not willing to learn, no one can help you. If you are determined to learn, no one can stop you.

One day, in retrospect, the years of struggle will strike you as the most beautiful.

Sigmund Freud

Resumo

Uma importante causa de morbilidade e mortalidade no Homem é as infeções por bacilos de Gram negativo. A sua correta identificação é fundamental para a avaliação da doença e na implementação do tratamento adequado. No entanto, a cultura tem várias limitações, é um método demorado, laborioso e com relativa baixa sensibilidade. Estudos sugerem que muitos anaeróbios com significado clínico não são ou são erradamente identificados. Surge assim a necessidade de uma técnica que seja rápida e precisa, permitindo assim uma intervenção célere no diagnóstico destas infeções.

A utilização de técnicas de PCR na deteção de microrganismos tem revelado algumas vantagens, nomeadamente o aumento da sensibilidade e especificidade, a diminuição do tempo de resposta e a possibilidade de utilização de amostras durante a antibioterapia.

O objetivo deste trabalho foi a implementação de protocolos de PCR em tempo real (PCRtr) para a deteção, em amostras clínicas, de dois dos géneros mais prevalentes nas infeções por anaeróbios, *Prevotella* e *Bacteroides*, e a espécie *Bacteroides fragilis* cuja deteção foi abandonada por problemas na técnica de PCRtr. Os resultados obtidos foram comparados com os da cultura, de modo a avaliar as vantagens e limitações da técnica de PCRtr na deteção destes dois géneros em amostras clínicas.

Comparando os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) obtidos neste trabalho com os de outros estudos, podemos concluir que, no que diz respeito à sensibilidade e o VPP, os valores são baixos; mas os valores da especificidade e o VPN estes são concordantes.

Concluiu-se que a técnica de PCRtr pode ser uma ferramenta complementar na deteção de anaeróbios, sendo principalmente útil em amostras obtidas durante a antibioterapia de infeções graves e no caso de culturas negativas em infeções com elevada suspeição de conterem bactérias anaeróbias.

Abstract

Anaerobic Gram negative rods are involved in a variety of infections that are commonly associated with considerable morbidity and mortality. The correct identification of the agent is crucial for the disease evaluation and the implementation of a successful therapeutic treatment. According to several surveys, the most important anaerobic pathogens remain poorly characterized and conventional identification is a complicate, expensive, and time-consuming process. Therefore, there is a need for a rapid and accurate diagnostic assay that allows early and effective management of infected patients. Detection methods based on molecular biology represent a powerful mean for the identification of pathogens because since they show a high sensibility and specificity, they allow shorter time response and the usage of biological samples after the beginning of the antibiotherapy.

The main purpose of this study was the implementation of real time PCR (PCRtr) protocols for the detection of two of the most prevalent genus and the species in anaerobic infections (*Prevotella*, *Bacteroides* and *B. fragilis*) in biological samples which the detection was discarded for problems with the PCRtr technique.

The obtained results were compared with the ones from the anaerobic culture in order to evaluate the limitations and advantages of the PCRtr technique in the detection of the two genus in biological samples.

Comparing the sensibility, specificity and the positive and negative predictive values obtained in this study with others studies we concluded that the sensibility and predictive value was lower, and the specificity and negative predictive value was similar.

In conclusion, our study show that PCRtr technique could be a complementary tool in anaerobes detection mainly in biological samples that are collected after the beginning of the antibiotherapy. It can also be used in infections that have a high suspicion of anaerobic bacteria that are constantly negative by culture.

Índice

Elementos bibliográficos resultantes desta dissertação i
Agradecimentos ii
Resumo iv
Abstract v
Lista de Figuras viii
Lista de Tabelas ix
Lista de Abreviaturas xi
Nota prévia xiii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Taxonomia 2
1.1.1. *Bacteroides* 2
1.1.2. *Fusobacterium* 4
1.1.3. *Porphyromonas* 5
1.1.4. *Prevotella* 5
1.2. Importância clínica dos bacilos de Gram negativo 7
1.3. Fatores de virulência 9
1.4. Diagnóstico laboratorial 10
1.4.1. Colheita de amostras 10
1.4.2. Transporte e armazenamento 11
1.4.3. Cultura e Identificação 13
1.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real 16
1.6. Terapêutica 19
1.7. Objetivos 21
2. MATERIAL E MÉTODOS 22
2.1. Amplificação por PCRtr 22
2.1.1. Avaliação da especificidade analítica dos *primers* e sondas 25
2.1.2. Avaliação da sensibilidade analítica da PCRtr 26
2.2. Extração de DNA genómico total de cultura pura 27
2.3. Quantificação de DNA por espetrofotometria 28
2.4. Estudo das amostras clínicas 28
2.4.1. Processamento das amostras 29

2.4.2. Extração de DNA genómico total de líquidos biológicos 29
2.4.3. Extração de DNA genómico total de amostras purulentas 31
2.5. PCRtr das amostras clínicas 32
2.5.1. Critérios de aceitação dos resultados da PCRtr 32
2.6. Comparação dos resultados do método de referência (cultura) com os da PCRtr 32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
3.1. Amplificação por PCRtr 34
3.1.1. Otimização da PCRtr para o género *Prevotella* 34
3.1.2. Otimização da quantidade de DNA para o género *Bacteroides* e espécie *Bacteroides fragilis* 35
3.1.3. Estudo da especificidade analítica de *primers* e sondas para os géneros *Prevotella* e *Bacteroides* 36
3.1.4. Estudo da Sensibilidade analítica de *primers* e sondas para os géneros *Prevotella* e *Bacteroides* 37
3.2. Extração de DNA genómico total de líquidos biológicos 38
3.3. Extração de DNA genómico total de amostras purulentas 39
3.4. Resultados da PCRtr 40
3.5. Comparação dos resultados do método de referência (cultura) com os da PCRtr 43
4. CONCLUSÃO 46
4.1. Perspetivas futuras 47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48
7. ANEXOS 55

Lista de Figuras

Figura 1 – Colheita por punção aspirativa 11
Figura 2 - Meio de transporte para anaeróbios 12
Figura 3 - Ilustração do funcionamento de uma jarra de anaerobiose 14
Figura 4- Esquema da PCR..... 17
Figura 5 - PCRtr utilizando sondas TaqMan. 18

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espécies do grupo *Bacteroides fragilis*. 3
Tabela 2 - Outras espécies de *Bacteroides* que causam infeções no Homem. 3
Tabela 3 - Espécies de *Prevotella* clínicamente importantes. 6
Tabela 4 - Infeções mais comuns causadas por bactérias anaeróbias. 8
Tabela 5 - Sequências de *primers* e sondas utilizadas para deteção dos géneros *Prevotella*, *Bacteroides* e da espécie *Bacteroides fragilis*. 23
Tabela 6 - Condições da reação de amplificação para o género *Prevotella*. 24
Tabela 7 - Condições da reação de amplificação para o género *Bacteroides*. 24
Tabela 8 - Condições da reação de amplificação para a espécie *Bacteroides fragilis*.... 24
Tabela 9 - Espécies bacterianas utilizadas no estudo da especificidade analítica dos *primers* e sondas. 25
Tabela 10 - Concentrações de DNA testadas no estudo da sensibilidade da PCRtr. 26
Tabela 11 - Genomas de *Bacteroides fragilis*. 27
Tabela 12 - Genomas de *Prevotella melaninogenica*. 27
Tabela 13 - Distribuição das amostras biológicas por tipo de produto e hospital. 29
Tabela 14 - Resultados considerando o método de referência e o teste. 33
Tabela 15 - Concentrações de *primers* e sonda testadas para o género *Prevotella*. 34
Tabela 16 - Resultados da amplificação do género *Bacteroides* e espécie *Bacteroides fragilis*. 35
Tabela 17 - Resultados do estudo da especificidade analítica de *primers* e sondas para o género *Prevotella* e *Bacteroides*. 36
Tabela 18 - Estudo da sensibilidade da PCRtr para o género *Prevotella*. 37
Tabela 19 - Estudo da sensibilidade da PCRtr para o género *Bacteroides*. 38
Tabela 20 - Resultados da PCRtr para o género *Prevotella*. 38
Tabela 21 - Variantes do protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen detection*. 39
Tabela 22 - Resultados da PCRtr (*Bacteroides*) das 3 variações ao protocolo original. 40
Tabela 23 – Resultados positivos por cultura (HEM). 40
Tabela 24 – Resultados positivos da PCRtr. 41
Tabela 25 – Resultados positivos para o género *Prevotella* por PCRtr. 41

Tabela 26 – Resultados positivos para o género *Bacteroides* por PCRrt. 42
Tabela 27 – Comparação da cultura com a PCRtr para o género *Prevotella*. 43
Tabela 28 – Comparação da cultura com a PCRtr para o género *Bacteroides*. 43

Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius

µL – Microlitro

µM – Micromolar

BHQ – *Black hole quencher* ®

BLAST – *Basic local alignment search tool*

UFC – Unidade formadora de colónias

CHLO – Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental

CLSI – *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CO_2 – Dióxido de carbono

Ct – *Threshold* c*ycle*

DNA – D*eoxyribonucleic acid*

DO – Densidade ótica

dsDNA – *Double-stranded* DNA

ESBL – *Extended-spectrum β-lactamases*

FAM – 6-Carboxifluoresceína

fg – Fentogramas

FRET – *Fluorescence resonance energy transfer*

g – Grama

g – Gravidade

GC – Guanina e citosina

H_2 – Hidrogénio

HEM – Hospital de Egas Moniz

HSC – Hospital de Santa Cruz

HSFX – Hospital de São Francisco Xavier

mL – Mililitro

mg/ µL – miligrama por microlitro

N_2 - Nitrogénio

ng/ µL – Nanograma por microlitro

O_2 – Oxigénio

pb – Par de bases

PCR – *Polymerase chain reaction*

PCRtr – PCR em tempo real

rpm – Rotações por minuto

rRNA – *Ribosomal ribonucleic acid*

TAMRA – *Tetramethylrhodamine*

TSA – Teste de sensibilidade aos antibióticos

UG – Unidade genómica

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

Vt – Volume total

Nota prévia

O tema inicial desta dissertação para obtenção do grau de mestre, foi a "Determinação dos Enterotipos numa população portuguesa". No decorrer desse trabalho foi feita a revisão bibliográfica para escolha dos *primers* para deteção dos enterotipos (genéros *Prevotella*, *Bacteroides* e *Ruminococcus*) e bactérias totais, a otimização dos vários protocolos de PCR em tempo real com *SYBR green I*, otimização da extração de DNA de amostras fecais, e a preparação das curvas de calibração para a quantificação. Para as curvas de calibração dos géneros *Prevotella* e *Bacteroides*, recorreu-se a DNA de estirpes de referência. Para o género *Ruminococcus*, por dificuldade na obtenção de uma estirpe de referência, optou-se por realizar a curva de calibração recorrendo a um plasmídeo. Neste plasmídeo foi inserido, por clonagem, a sequência alvo amplificada de uma amostra de fezes. Para confirmação da seleção dos clones corretos foi efetuada a técnica de sequenciação. No entanto, verificou-se que as sequências obtidas não apresentavam homologia com a sequência pretendida (análise do BLAST).

Em adição a este problemam, tivemos também dificuldades na obtenção de amostras fecais de voluntários nos grupos etários de interesse.

Por estas razões, optou-se por alterar o rumo do trabalho de investigação, mantendo a deteção por PCR em tempo real dos dois géneros *Prevotella* e *Bacteroides*, em amostras clínicas com pedidos de exame cultural em anaerobiose.

1. INTRODUÇÃO

A extensa classificação das bactérias como aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias estritas baseia-se no tipo de metabolismo que estas utilizam para produzirem a energia necessária para o seu crescimento [2]. As bactérias aeróbias utilizam a molécula de oxigénio como molécula aceitadora final de eletrões e não conseguem sobreviver na sua ausência. As bactérias anaeróbias estritas, pelo contrário, não conseguem crescer na presença do oxigénio, já que este é tóxico, dependendo de outras moléculas como aceitadoras finais de eletrões [2, 3]. O metabolismo destas bactérias é do tipo fermentativo, no qual os compostos orgânicos são reduzidos a vários produtos, tais como ácidos orgânicos e álcoois [2]. A toxicidade do oxigénio deve-se à ausência das enzimas que degradam os produtos tóxicos resultantes da respiração celular, a superóxido dismutase, a catalase e/ou a peroxidase [2, 3]. A ausência destas enzimas leva à acumulação de radicais livres que irão inevitavelmente conduzir à morte da bactéria [2].

A primeira bactéria anaeróbia foi descoberta em 1862 por Louis Pasteur [4, 5], mais tarde designada de *Clostridium butyricum*. No entanto, a primeira notificação de uma bactéria anaeróbia (*Bacteroides fragilis*), isolada a partir de uma amostra clínica só foi publicada em 1893 por Veillon e Zuber [4, 5]. O seu nome adveio da dificuldade que estes investigadores tiveram com o seu crescimento [4].

Entre 1909 e 1938 foram conduzidos vários estudos que são atualmente considerados como referências relativamente aos anaeróbios [4]. No período de 1940 a 1960, apenas o Tétano, Botulismo e Gangrena eram abordadas nas escolas de Medicina, sendo todas as outras infeções por anaeróbios negligenciadas [4]. No entanto, na década de 60 ocorreram avanços importantes nesta área devido às investigações de Finegold, Sutter, Dowell e Holdeman, sendo por isso considerada a Era de ouro para os anaeróbios [6].

O desenvolvimento do primeiro sistema de geração de atmosfera de anaerobiose, de meios de cultura seletivos e protocolos específicos para isolamento e identificação das bactérias anaeróbias simplificou o manuseamento destas bactérias [4, 7] e reforçou a sua importância clínica [6].

1.1. Taxonomia

O advento da Biologia Molecular promoveu profundas alterações na taxonomia das bactérias anaeróbias com a identificação de novas espécies e reclassificação de outras [8, 9]. A utilização da percentagem de GC, hibridação de DNA e sequenciação de genes 16S e 23S rRNA, em detrimento das técnicas fenotípicas (reações de fermentação, perfis enzimáticos) [10, 11, 12, 13, 14] proporcionou um avanço não só na classificação mas também na identificação de bactérias, especialmente nas espécies não cultiváveis [15].

As alterações mais acentuadas ocorreram nos bacilos de Gram negativo, particularmente no género *Bacteroides*, já que algumas espécies sacarolíticas pigmentadas deste género foram reclassificadas no género *Prevotella* e as espécies assacarolíticas no género *Porphyromonas* [8, 10].

O conjunto das bactérias anaeróbias abrange espiroquetas, bacilos e cocos de Gram positivo e negativo [2]. Dentro dos cocos de Gram positivo, os géneros mais frequentemente isolados são: *Peptostreptococcus* [16], *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* e *Peptoniphilus* [17]. No que diz respeito aos cocos de Gram negativo apenas o género *Veillonella* é encontrado em amostras clínicas [18]. Nos bacilos de Gram positivo, os géneros com maior relevância clínica são os *Actinomyces*, *Propioniobacterium* e *Clostridium*.

Apesar desta grande diversidade, no presente trabalho apenas nos focaremos nos bacilos de Gram negativo por serem clínicamente os mais relevantes [16, 19, 20].

Os bacilos de Gram negativo mais frequentemente isolados no Homem pertencem aos géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Prevotella* [8, 16].

1.1.1 *Bacteroides*

Estes bacilos são filamentosos, pleomórficos, podem apresentar dilatações terminais ou centrais e vacúolos [8]. São esculina positivos, fermentadores de carbohidratos [8] e são resiststes à bílis [9, 10, 21].

Este género é predominante na microbiota intestinal compreendendo 25% da população anaeróbica do cólon [22, 23]. Estas bactérias beneficiam o hospedeiro coadjuvando nas

funções metabólicas, protetoras e tróficas [24]. No entanto, podem tornar-se patogénicos se as condições se alterarem [22].

As espécies pertencentes ao grupo *Bacteroides fragilis* (tabela 1) são os agentes anaeróbios mais frequentemente isolados no Homem [22, 23] estando associado a uma grande variedade de infeções como abcessos intra-abdominais, feridas infetadas e bacteriémia [25].

Tabela 1 - Espécies do grupo *Bacteroides fragilis*.

B. fragilis	*B. merdae*	*B. thetaiotaomicron*
B. caccae	*B. ovatus*	*B. uniformis*
B. distasonis	*B. stercoralis*	*B. vulgatus*
B. eggerthii		

Este grupo contribuí significativamente para morbilidade e mortalidade na bacteriémia [21] tendo-se verificado num estudo realizado por Kato e col. que aproximadamente 30% dos casos de bacteriémias são causadas por *B. fragilis* [25, 26]. A distribuição das diferentes espécies deste grupo, nas restantes infeções, foi descrita num estudo da seguinte forma: *B. fragilis* com 63%, *B. thetaiotaomicron* com 14%, *B. vulgatus* e *B. ovatus* com 7% cada, *B. distasonis* com 6% e *B. uniformis* com 2% [21].

Muitos destes microrganismos possuem fatores de virulência que potenciam a aderência das bactérias, a lesão tecidular e potenciam a formação de abcessos [6, 21].

A espécie *B. fragilis* é considerado a mais virulenta do grupo [26, 27] com uma mortalidade de cerca 19% [27]. Dentro desta espécie, Myers e col. reportaram em 1987 a associação entre estirpes enterotoxigénicas de *B. fragilis* e diarreia, existindo atualmente uma larga evidência desta associação [26].

Dentro do género *Bacteroides* existem outras espécies que causam infeção no Homem (tabela 2).

Tabela 2 - Outras espécies de *Bacteroides* que causam infeções no Homem.

B. capillosus	*B. putredinis*	*B. pyogenes*	*B. tétum*
B. coagulans	*B. forsythus*	*B. splanchnicus*	*B. ureolyticus*

Por exemplo, *B. ureolyticus* é encontrado na microbiota do trato gastrointestinal e genital e menos frequentemente na cavidade oral [9]. Esta espécie tem sido isolada em infeções de vários locais incluído infeções da cabeça e pescoço, intra-abdominais, genitais e dos tecidos moles [9].

Quanto à resistência aos antimicrobianos, os membros do grupo *B. fragilis* exibem uma grande variabilidade interespécies [21]. As resistências neste grupo são importantes (já foi inclusivamente reportada a produção de β-lactamase em *B. fragilis*) [5, 25] e têm vindo a aumentar [22, 21] embora se verifique que os valores divergem regional e temporalmente [25]. Assim, a escolha do antimicrobiano deve ser ponderada e, quando necessário, efetuado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

1.1.2. *Fusobacterium*

Trata-se de um género antigo de bacilos de Gram negativo [10]. O nome provém da morfologia destas bactérias – pequeno bacilo fusiforme (*Fusus* – fuso; *bacterion* – pequeno bacilo) [28]. No entanto, a morfologia das espécies deste género varia podendo ser fusiforme como no caso de *F. nucleatum* ou pleomórfica como *F. necrophorum* [8]. Estes microrganismos são encontrados na microbiota dos tratos respiratório, gastrointestinal [19] e genital [9] e são usualmente isolados de abcessos peritonsilares (resultante de amigdalites), infeções da cabeça e pescoço, abcessos cerebrais, meningites, infeções genitais e abcessos intra-abdominais [19].

Dentro deste género a espécie mais frequentemente isolada no Homem é *F. nucleatum* [19, 20] estando frequentemente associada a infeções periodontais [28]. As espécies *F. varium*, *F. mortiferum* e *F. necrophorum* também apresentam relevância clínica, especialmente a última, fortemente associada à doença de Lemierre, doença grave comumente diagnosticada em adultos jovens [8, 19, 20].

1.1.3. *Porphyromonas*

Este género incluí bactérias pigmentadas [19] assacarolíticas de origem humana e animal [8]. A grande maioria das espécies isoladas de humanos são catalase negativo, enquanto as isoladas de animais são positivo [8].

Estes microrganismos são encontrados principalmente na microbiota oral de humanos e animais, e menos frequentemente no trato gastrointestinal e genito-urinário [9]. As bactérias deste género têm sido isoladas numa variedade de infeções, incluíndo mordeduras [9].

A espécie *P. endodontalis* tem sido isolada maioritariamente da cavidade oral [19] sendo um agente patogénico chave nas infeções endodônticas, como infeções dos canais radiculares e abcessos [29]. A espécie *P. gingivalis* também é isolada da cavidade oral [19] sendo frequente em periodontites, menos comum em infeções odontogénicas [9, 30] e ocasionalmente é isolada de infeções intra-abdominais, tais como apendicites e peritonites [30]. Trata-se de um bacilo com pigmentação preta com vários fatores de virulência e com metabolitos citotóxicos [31]. A espécie *P. asaccharolytica* faz parte da microbiota do cólon e trato genital [19], sendo isolada de uma variedade de infeções como empiema pleural, peritonites, abcessos peri-retais e abcessos dos pés [29].

1.1.4. *Prevotella*

O género *Prevotella* é composto maioritariamente por bactérias sacarolíticas, pigmentadas e não pigmentadas, que outrora pertenceram ao género *Bacteroides* [8, 10].

As espécies deste género (tabela 3) são as segundas bactérias anaeróbias mais isoladas de infeções no Homem, logo abaixo das espécies do grupo *B. fragilis* e dos cocos anaeróbios de Gram positivo [19].

Tabela 3 - Espécies de *Prevotella* clinicamente importantes.

P. bivia	*P. disiens*	*P. melaninogenica**
P. buccae	*P. enoeca*	*P. nigrescens**
*P. corporis**	*P. heparinolytica*	*P. oris*
P. dentalis	*P. intermedia**	*P. tannerae**
*P. denticola**	*P. loescheii**	*espécies pigmentadas

As espécies pigmentadas são encontradas predominantemente na microbiota oral [32] e vaginal sendo isoladas em infeções mistas relacionadas com estes locais, no entanto, também podem ser isoladas de outros locais anatómicos. São agentes importantes em feridas infetadas, mordeduras, sendo também identificadas em infeções da cabeça, pescoço e trato respiratório inferior [19], incluíndo fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crónica [32]. As espécies mais isoladas da cavidade oral são: *P. corporis*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loeschii*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens* [19]. As espécies *P. corporis* e *P. intermedia* têm sido identificadas em abcessos peritonsilares [19]. A espécie *P. dentalis* é comumente encontrada nas infeções dos canais radiculares e nas bolsas periodontais [9] enquanto o grupo *P. intermedia*/*P. nigrescens* é habitualmente encontrado na cavidade oral de indivíduos com e sem problemas periodontais, assim como em infeções extra-orais [30]. Estas duas últimas espécies não são possíveis de discriminar com os testes fenotípicos de rotina [30]. A espécie *P. melaninogenica* produz um pigmento de cor castanho a preto, que deriva do grupo heme da hemoglobina do meio de cultura [20].

As espécies não pigmentadas, *P. bivia* e *P. disiens*, são habitualmente encontradas em infeções do trato genital feminino e menos frequentemente de infeções da cavidade oral e do trato respiratório [19]. As espécies *P. oris* e *P. buccae* são isoladas em diferentes infeções orais e pleuro-pulmonares [19].

Cerca de 30 a 50% das estirpes de *Prevotella* isoladas de infeções no Homem produzem a enzima β-lactamase. No entanto, se forem testados vários isolados da mesma amostra esta proporção pode ser ainda mais elevada [10]. Já foi também reportada a produção de lactamase de espetro alargado (ESBL – *extended-spectrum β-lactamases*) [32]. Estirpes produtoras de ESBL tem sido associadas a falhas no tratamento com cefalosporinas, aumentando deste modo, a mortalidade nas infeções nosocomiais [32].

1.2. Importância clínica dos bacilos de Gram negativo

Um grande número de bacilos anaeróbios de Gram negativo causa infeções no Homem [9, 23] sendo uma causa significante de morbilidade e mortalidade [6, 33, 34].

A microbiota vaginal pode albergar 5 vezes mais bactérias anaeróbias do que aeróbias e os sulcos gengivais e o cólon tem uma proporção de 1000 para 1 [4]. Este facto pode explicar o porquê de as infeções dentárias e perfurações do cólon estarem associadas frequentemente a bactérias anaeróbias [4].

No cólon, onde a tensão de oxigénio é baixa, a densidade da microbiota atinge o seu máximo na parte distal com uma concentração estimada de 10^{11} microrganismos/g de fezes [2]. A microbiota intestinal é complexa e incluí populações heterogéneas presentes tanto nas fezes como nas mucinas que aderem à superfície das células epiteliais intestinais [6]. Neste órgão, os anaeróbios impedem a colonização por populações microbianas patogénicas, para além de contribuírem para a homeostase do hospedeiro através da produção de vitamina K, desconjugação de ácidos biliares e outros processos de biotransformação [6]. O desequilíbrio da microbiota intestinal aumenta o risco de infeção por anaeróbios [6, 17].

As infeções causadas por bactérias anaeróbias podem ocorrer em qualquer local do corpo e, a não ser em raras exceções provém da microbiota do hospedeiro [4, 35]. No entanto, para que surja doença no hospedeiro, é necessário que haja algum tipo de alteração, quer seja na função ou na estrutura do seu habitat [2, 6, 20]. Esta alteração pode ocorrer através da quebra na barreira mucosa, insuficiência vascular localizada, obstrução mecânica ou outro tipo de patologia que possa comprometer o potencial de oxidação-redução nos tecidos e com isto potenciar um rápido crescimento de bactérias anaeróbias [6, 20, 33]. Patologias metabólicas como Diabetes *Mellitus*, neutropénia, hipogamaglobulinémia, neoplasias, terapia imunossupressora, vários procedimentos cirúrgicos, feridas, parto, pneumonia de aspiração, mordedoras de animais e humanos, introdução de materiais estranhos (p.ex. cateteres e próteses), população envelhecida e terapia antimicrobiana inapropriada são exemplos de fatores que contribuem para o desenvolvimento de infeções por anaeróbios [17, 36].

Muitas destas infeções são polimicrobianas, ou seja, o tecido infetado contém usualmente uma mistura de vários tipos de anaeróbios albergando também bactérias

aeróbias e anaeróbias facultativas [2, 37]. Existem certas pistas que indicam que se pode tratar de uma infeção por bactérias anaeróbias, já que este tipo de infeções são na sua grande maioria infeções supurativas podendo causar abcessos e necrose tecidular [20, 35, 38]. O odor fétido, infeção próxima de membranas mucosas, formação de abcessos, necrose [35], infeção secundária a mordeduras, antibioterapia prévia com antibióticos de baixa atividade contra anaeróbios [39], tromboflebite séptica e formação de gás nos tecidos [38] pelo menos em fases mais avançadas da infeção, são exemplos de pistas [4].

Na tabela 4 estão representadas as infeções comumente causadas por bactérias anaeróbias.

Tabela 4 - Infeções mais comuns causadas por bactérias anaeróbias.

Bacterémia	Bacterémia após extração dentária
Sistema nervoso central	Abcessos cerebrais e epidurias
	Empiema subdural
Cabeça e pescoço	Sinusite crónica
	Infeções do pescoço após cirurgia
	Abcessos peritonsilares
Dental, oral, facial	Infeções dos canais radiculares
	Abcessos periapicais e periodontais
	Otite média crónica
Torácicas	Pneumonia de aspiração
	Abcessos pulmonares
Abdominais	Apendicite com peritonite
	Infeções de feridas cirúrgicas após cirurgia
	Infeções do trato biliar
Ginecológicas/obstétricas	Abcessos vaginais e pélvicos
	Aborto séptico
Tecidos moles	Mordeduras
	Pé diabético
	Abcessos perirectais
	Osteomielite
	Gangrena gasosa

1.3. Fatores de virulência

Com exceção do género *Clostridium*, que tem sido estudado extensivamente, o processo pelo qual os anaeróbios originam doença no Homem ainda não é bem compreendido. A partir do momento em que os mecanismos que impedem as bactérias anaeróbias de se tornarem patogénicas sejam comprometidos, estas ficam livres para expressar os vários fatores de virulência [6]. A adesão é um destes mecanismos, por exemplo, após uma lesão no trato gastrointestinal, a população anaeróbia adere rápida e fortemente ao mesotélio do peritoneu [6]. Este fator de virulência tem grande impacto nas infeções intra-abdominais, porque permite às bactérias resistir à eliminação da cavidade peritoneal [6]. Esta situação conduz à estimulação de uma série de eventos celulares, nomeadamente a infiltração de leucócitos polimorfonucleares até ao local de infeção e deste modo à formação de abcessos [2].

A presença de cápsula atua como barreira contra a penetração dos antimicrobianos aumentando assim a virulência das bactérias [2] e dificulta a fagocitose.

Outro fator de virulência frequente é a produção de toxinas ou enzimas que causam dano tecidular [6]. As espécies dos géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* produzem enzimas como colagenase, Dnases, heparinases, proteinases e neuraminidases, que desempenham um papel importante na infeção, por facilitarem a penetração destes microrganismos nos tecidos [20]. Várias outras bactérias anaeróbias produzem outras enzimas como protéases, lípases, hialuronidases e condroitina sulfatases [2]. Enzimas como as β-lactamases podem também atuar como fator de virulência inativando os antibióticos com anel β-lactâmico [2].

Outro mecanismo comum dos anaeróbios trata-se da sinergia entre bactérias aeróbias e anaeróbias encontrada nas infeções polimicrobianas [4], como em infeções intra-abdominais, ginecológicas e no pé diabético [37]. As infeções polimicrobianas proporcionam um ambiente ótimo para a troca de elementos genéticos entre aeróbios e anaeróbios, podendo resultar num aumento não só da virulência mas também na resistência aos antimicrobianos [37]. Já foi documentada a troca de elementos genéticos que conferem resistência para um vasto grupo de antimicrobianos como clindamicina [40], cefoxitina, imipenem, tetraciclina, cloranfenicol e metronidazol [37].

1.4. Diagnóstico laboratorial

O "laboratório dos anaeróbios", como uma secção independente dentro dos laboratórios de microbiologia, é muitas vezes visto mais como uma despesa luxuriante do que propriamente uma necessidade clínica em muitos laboratórios [6].

Após o auge no estudo da etiologia e das manifestações clínicas das infeções por anaeróbios, que ocorreu nas décadas de 60 e 70, "a microbiologia dos anaeróbios" retrocedeu na maioria dos laboratórios devido a uma multiplicidade de fatores [5]:

- A cultura de bactérias anaeróbias requer que a colheita e transporte sejam apropriados;
- A paciência do microbiologista é posta à prova aquando do crescimento, geralmente mais lento, destas bactérias [5, 39];
- O custo da cultura das bactérias anaeróbias é 5 vezes superior à dos aeróbios, não sendo considerada rentável por muitos autores [5].

Por estas razões o tratamento empírico tornou-se uma prática recorrente nas infeções por anaeróbios [5].

Apesar de tudo isto, a importância clínica destas bactérias não diminuiu, continuando a ser uma importante causa de morbilidade e mortalidade [6]. O sucesso do isolamento destas bactérias é geralmente afetado pela seleção da amostra, do método de colheita, transporte, armazenamento, dos meios de cultura e da sua qualidade [35] e ainda, dos reagentes, equipamentos e dos procedimentos *in-house* utilizados [8].

1.4.1. Colheita de amostras

Como já referido, as infeções por anaeróbios são originadas principalmente por bactérias da microbiota e são maioritariamente uma mistura de bactérias anaeróbias estritas e facultativas [2, 6, 35]. Grande parte destas infeções causam abcessos e/ou destruição tecidular em áreas em contacto com as mucosas. Por estas razões, aquando da colheita das amostras, é essencial evitar a contaminação com a microbiota [2, 35]. Estes problemas não ocorrem em amostras de locais normalmente estéreis, como sangue,

líquido pleural e sinovial, desde que sejam tomadas as precauções habituais de descontaminação da pele antes da sua obtenção [2].

As amostras clínicas mais adequadas para o isolamento de bactérias anaeróbias são sangue e outros fluidos biológicos, amostras colhidas em cirúrgias ou biópsias, pús colhido por punção aspirativa de abcessos fechados (figura 1) e fluidos colhidos por punção pulmonar percutânea [35].

Os aspirados são geralmente considerados como as melhores amostras para cultura [35, 39, 41].

Figura 1 – Colheita por punção aspirativa. Os aspirados devem ser efetuados em pele intacta após descontaminação com álcool seguido de iodopovidona. Adaptado de [41]

Amostras colhidas através de outros métodos para além de agulha e seringa como exsudados efetuados com zaragatoa, são muitas vezes enviados para cultura para pesquisa de anaeróbios, embora esta colheita esteja mais sujeita a ser contaminada com a microbiota e a quantidade de amostra recolhida ser menor [35, 39]. Se ainda assim, for necessário a execução da colheita por este método (zaragatoa) devem ser utilizados os *kits* existentes para o efeito [2, 39]. As amostras fecais, expetoração, exsudados naso-faringeos ou vaginais não devem ser utilizados devido à contaminação com a microbiota [2, 39].

1.4.2. Transporte e armazenamento

Idealmente as amostras para pesquisa de anaeróbios devem ser inoculadas imediatamente após a colheita. No caso de não ser possível, e de forma a proteger as amostras dos efeitos deletérios do O_2, estas devem ser transportadas nos meios

disponíveis para esse efeito e armazenados à temperatura ambiente [39]. Um armazenamento a temperaturas superiores pode causar sobrecrescimento bacteriano ou perda de algumas estirpes, ao passo que a refrigeração permite uma maior difusão do O_2 [39].

A amostra é injetada para um frasco contendo um meio com agentes redutores, normalmente meio *Cary-Blair* modificado, e com um indicador de tensão de O_2 (normalmente resazurina) através de uma tampa de borracha, permanecendo numa atmosfera livre de O_2 até esta ser processada pelo laboratório [2, 39]. Na figura 2 encontra-se um exemplo de um meio de transporte.

Figura 2 - Meio de transporte para anaeróbios – portagerm amies agar, bioMérieux. Adaptado de http://www.laboratorio.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=195;setid=7855;id=10417

Num meio de transporte adequado, as bactérias anaeróbias podem sobreviver até vários dias consoante o tipo de produto em questão [39]. Amostras purulentas contêm inúmeros compostos redutores tendo estas amostras maior viabilidade do que quando comparados com os líquidos biológicos [39].

Quando as amostras são colhidas para tubos esterilizados (opção menos favorável), a quantidade de amostra deve ser a maior possível para que a exposição ao ar possa ser minimizada [35].

A entrega ao laboratório deve ser célere, já que a hidratação da amostra contribui para a manutenção da viabilidade das bactérias [41].

Mesmo quando os meios de transporte são utilizados, é recomendado iniciar as sementeiras para a cultura dentro de 3 a 6 horas [35].

1.4.3. Cultura e Identificação

Antes das amostras serem inoculadas, deve ser efetuado o exame macroscópico das mesmas, já que este tipo de amostras são frequentemente purulentas, podendo conter sangue já digerido (acastanhado) e mau odor devido aos ácidos gordos voláteis e produtos do metabolismo como aminas [35, 39].

Os meios de cultura para isolamento de anaeróbios devem ser efetuados em ambiente de anaerobiose [35]. Devem ser utilizados meios não seletivos e de enriquecimento, sendo que este último servirá apenas como reserva [35]. No caso de amostras supurativas que possam estar contaminadas com a microbiota, devem ser utilizados meios seletivos [35]. Os meios não seletivos podem ser gelose de Columbia suplementada com sangue de carneiro, *Egg-yolk agar*, *Peptone-yeast extract glucose broth*, caldo de carne e caldo de tioglicolato [39, 42]. Estes meios podem ser suplementados com vitamina K e hemina, tornando assim o meio altamente nutritivo para o desenvolvimento de anaeróbios [43]. A hemina e o heme provenientes do sangue de carneiro são necessários a uma variedade de anaeróbios e promovem o seu crescimento [43]. A vitamina K é essencial para certas estirpes de *Prevotella melaninogenica* e potencia o crescimento de algumas estirpes de *Bacteroides* [43]. Os meios podem conter também agentes redutores, como a cisteína e tioglicolato, que ajudam a diminuir o O_2 [42]. Os meios seletivos e diferenciais podem ser o *Brucella agar* suplementado com 5% de sangue de carneiro, vitamina K e hemina, *Bacteroides bile esculin agar*, para o crescimento seletivo e diferencial de bactérias do grupo *Bacteroides fragilis* [39], *Kanamycin-vancomycin laked blood agar*, para o isolamento seletivo de *Prevotella* e *Bacteroides* e *Phenylethyl alcohol shepp blood agar* para inibição dos anaeróbios facultativos de Gram negativo [39, 42]. No entanto, existe uma grande variedade de meios de cultura no mercado, sendo que a escolha deve ser efetuada consoante as necessidades de cada laboratório [42].

As amostras devem ser incubadas a 35-37ºC em aerobiose e anaerobiose para a distinção dos anaeróbios facultativos [44], sendo que as placas para a atmosfera de anaerobiose devem ser inoculadas o mais rapidamente possível [35]. A observação da cultura primária só deve ser efetuada após, pelo menos, 48 horas de incubação e deve ser mantida até 7 dias antes de serem consideradas como negativas [35], [43].

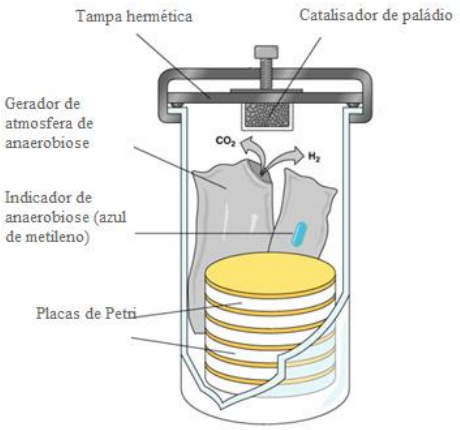


Figura 3 - Ilustração do funcionamento de uma jarra de anaerobiose. Adaptado de http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap06/lecture2.htm

Existem várias técnicas disponíveis para a manutenção da atmosfera de anaerobiose, tais como, jarras (figura 3), caixas, sacos e câmara de anaerobiose, sendo a jarra a mais utilizada [2, 39]. Trata-se de uma jarra de plástico ou vidro com tampa hermética, que pode ser configurada através de vários métodos. Num dos métodos é necessário a introdução de H_2 na jarra, que na presença de um catalisador (normalmente paládio revestido com partículas de alumina), reage com o O_2 dentro da jarra sendo convertido em água, produzindo desta forma a atmosfera de anaerobiose [2, 39]. Outro dos métodos recorre à utilização de geradores de gás, que em muitos casos libertam H_2 e CO_2 podendo ou não ser necessário a presença do catalisador e adição de água [39]. Neste caso, em vez da jarra também podem ser utilizados sacos apropriados para o efeito e que fecham hermeticamente. Outro método que pode ser utilizado, mas aqui apenas com as jarras de anaerbiose, consiste na remoção do ar da jarra selada contendo os meios de cultura e substituição por uma mistura de 80- 90% de N_2, 5-10% de H_2, 5-10% de CO_2 e livre de O_2 [2, 39, 45]. Estes métodos tem resultados similares em termos de recuperação de anaeróbios [39].

A câmara de anaerobiose também é utilizada para o isolamento de anaeróbios. Esta contém uma antecâmera, que é utilizada para introdução de material sem haver entrada de O_2 [39], contendo uma mistura de 85- 90% de N_2, 5-10% de CO_2 e 5% de H_2 [2, 39]. A atmosfera da câmara é conseguida através do H_2 e do catalisador [39]. A câmara permite o processamento de um grande número de amostras [2, 39].

Independentemente do sistema de incubação que é utilizado é importante incluir sempre um indicador de atmosfera de anaerobiose (azul de metileno ou resazurina) [39, 43]. Estes indicadores em presença de baixas concentrações de O_2 ficam incolores [39].

A identificação de anaeróbios é complexa e os laboratórios podem usar diferentes sistemas de identificação [44]. A identificação convencional é baseada nas características fenotípicas como morfologia das colónias, exame microscópico pela coloração de Gram, crescimento em meios seletivos e uma variedade de testes bioquímicos [46]. A coloração de Gram deve sempre preceder a identificação bioquímica [2], e permite ainda avaliar a presença de indicadores de inflamação, como os neutrófilos [35], contaminação superficial, como células epiteliais escamosas e o tipo e número de bactérias presentes [47].

As características bioquímicas para identificação podem incluir a fermentação de açúcares, solubilidade em bílis, hidrólise da esculina, amido e agar, digestão da caseína, catalase, lípase, lecitinase, produção de indol, redução dos nitratos, ácidos gordos voláteis (determinado por cromatografia gasosa) [44] e testes de sensibilidade a quimioterápicos (vancomicina, canamicina e colistina) [39]. Em geral, deve ser efetuada a identificação do grupo *B. fragilis* já que se trata do grupo mais frequentemente isolado em infeções graves e os seus membros estão entre os anaeróbios com maior resistência aos antimicrobianos [39]. Para a identificação bioquímica das bactérias anaeróbias isoladas, podem ser utilizados métodos semi-automáticos e automáticos [46]. Existem vários equipamentos e *kits* para identificação dos anaeróbios clinicamente relevantes, como o *RapID-ANA II panel*, o *Minitek systems*, o *Vitek ANI card*, o *BBL Crystal ANR*, o *API rapid ID 32 A system* e o *API 20 A system*, e são habitualmente métodos de identificação simples, rápidos e satisfatórios [48].

O *card* Vitek ANC (bioMérieux) foi criado para a rápida identificação dos anaeróbios clinicamente relevantes e de espécies de *Corynebacterium* [48]. Contém 64 micropoços com 36 testes enzimáticos colorimétricos sendo que 13 são testes de fermentação, 17 são testes de glicosidase e arilamidase, 2 são reações alcalinas e 4 são outros testes bioquímicos [48]. Permite a identificação de 20 géneros: *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Bacteroides* (*Parabacteroides*), *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Corynebacterium*, *Eggerthella*, *Eubacterium*, *Finegoldia*, *Fusobacterium*,

Lactobacillus, *Microbacterium*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Proprionibacterium*, *Staphylococcus* e *Veillonella* [48].

Estudos sugerem que um número significativo de anaeróbios com significado clínico não é detetado ou permanece mal caraterizado devido apenas ao uso exclusivo das técnicas fenotípicas [34]. Apenas cerca de 50 – 75% dos anaeróbios de várias fontes estão caracterizados satisfatoriamente e cerca de 27% dos laboratórios nunca identificam anaeróbios. Isto pode ser devido aos complicados métodos convencionais de identificação, ao elevado custo e à falta de capacidade de fornecer resultados rápidos [34]. Por estas razões, uma técnica que seja rápida e precisa, permitindo assim uma intervenção efetiva, seria uma evolução importante no diagnóstico destas infeções [34].

1.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Os métodos moleculares estão a revolucionar a prática clínica [49], emergindo como técnicas alternativas ou complementares aos métodos fenotípicos [21], na identificação das bactérias, no estudo da relação hospedeiro-parasita e na classificação taxonómica [34]. O método molecular mais utilizado na identificação das bactérias é a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) e as suas variações [31, 34]. Desde a sua introdução, em 1985, que esta ferramenta tornou-se fundamental [49]. Esta técnica tem sido utilizada na deteção de bactérias difíceis ou impossíveis de cultivar [31], na avaliação de infeções emergentes, na vigilância, na deteção rápida de agentes no bioterrorismo e nos perfis de resistência aos antimicrobianos [49]. A PCR têm-se revelado uma ferramenta essencial para o diagnóstico atempado e preciso, fulcral para o bom prognóstico dos doentes [49].

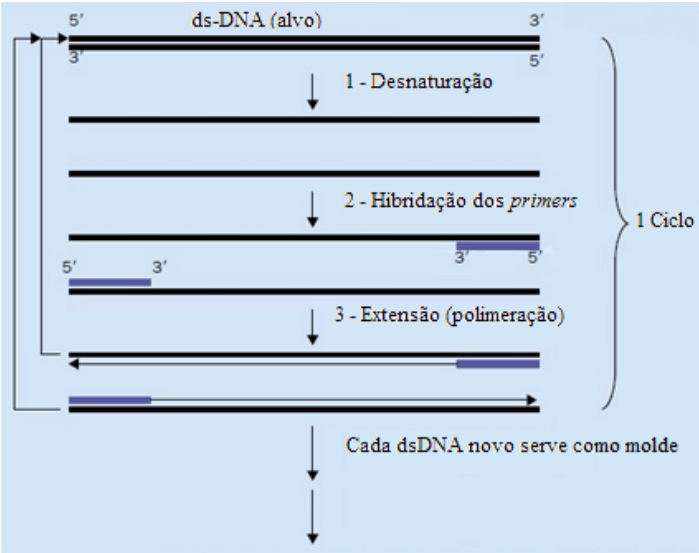


Figura 4- ESQUEMA DA PCR. A reação ocorre num termociclador em que cada ciclo é constituído por 3 etapas: (1) desnaturação do dsDNA; (2) hibridação dos *primers* nas sequências alvo; (3) extensão dos *primers* e polimeração do DNA gerando cópias do DNA alvo. No fim da cada ciclo o DNA sintetizado serve como molde para o próximo ciclo. Adaptado de [49]

Trata-se dum processo enzimático para amplificação exponencial *in vitro* de pequenas quantidades de DNA [34], [49]. Para isso é necessário conhecer *a priori* pelo menos uma parte da sequência do DNA alvo para o desenho dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) [49]. Por vezes o desenho dos *primers* pode ser difícil quando há grande similaridade entre genes homólogos [50].

Na PCR, o DNA alvo é amplificado exponencialmente por uma polimerase de DNA termoestavél na presença dos *primers* e dos nucleótidos [49]. O termociclador executa múltiplos ciclos de aquecimento e arrefecimento, que correspondem aos ciclos de desnaturação do DNA, hibridação dos *primers* e a sua extensão [49] (figura 4). Este método tem o potencial de gerar biliões de cópias de DNA a partir de uma única cópia em menos de uma hora [49].

A PCR pode ser qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa [31]. A PCR quantitativa em tempo real (*Polymerase Chain Reaction in Real Time* – PCRtr) (figura 5) representou um avanço significativo e é caracterizada por uma quantificação contínua dos produtos gerados na reação, ou seja, a amplificação e a deteção do produto amplificado são realizadas simultaneamente [31, 49]. A quantidade de DNA inicial na reação pode ser aferido a partir do Ct (*Threshold cycle*) que é definido como o ciclo no qual há um sinal de fluorescência significativamente acima da fluorescência de fundo [34]. Para tal é

necessária uma curva de calibração que relaciona os Ct com várias concentrações de DNA conhecidas [34, 49]. Esta técnica representa um grande avanço por eliminar o processamento pós-amplificação que implica a realização de uma eletroforese [34, 49]. Para além disso a PCRrt é mais rápida, simples e reprodutível [49].

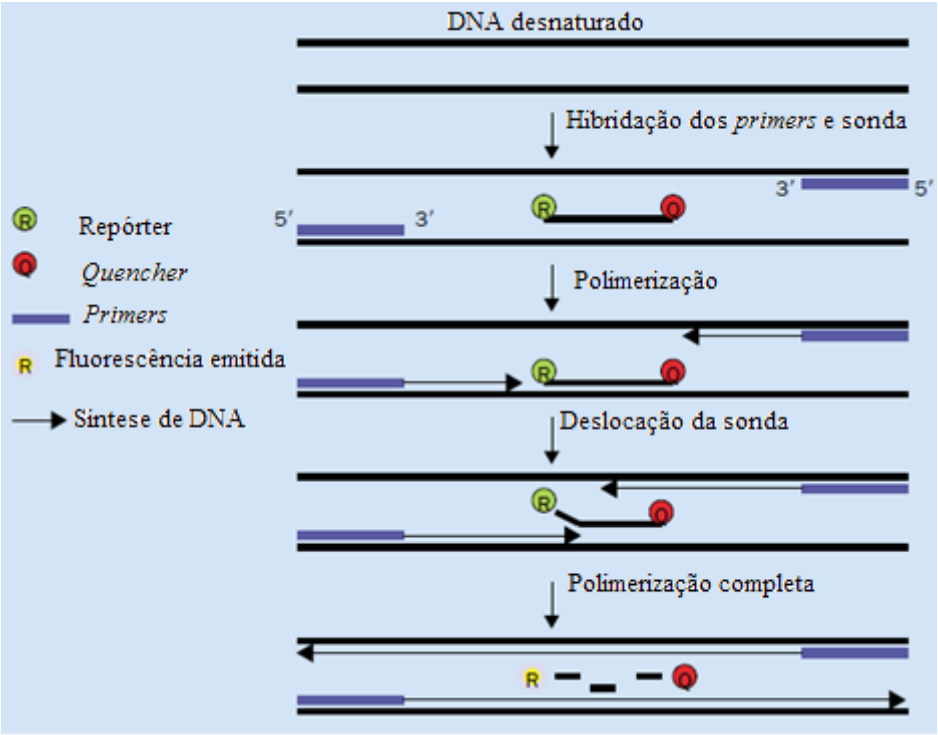


Figura 5 - PCRtr utilizando sondas TaqMan. As sondas TaqMan são oligonucleóticos de cadeia simples marcados com 2 fluoróforos diferentes. Na extremidade 5' encontra-se um emissor (*reporter*) e na extremidade 3' um recetor (*quencher)*. Quando a sonda está intacta, a fluorescência emitida pelo *repórter* é absorvida pelo *quencher*. Durante a extensão, a sonda é clivada devido à atividade 5'-exonuclease da Taq polimerase, separando-se o *reporter* do *quencher*, detectando-se a fluorescência emitida pelo *reporter*. À medida qua a amplificação prossegue, o aumento da fluorescência é proporcional à quantidade de produto amplificado. Adaptado de [49]

Para a deteção do produto amplificado podem ser utilizados fluoróforos, tais como, o SYBR-Green I, que se liga inespecificamente a dsDNA gerado durante a PCR [49]. Outro sistema é a utilização de sondas de DNA marcadas com fluorocromos que hibridam especificamente com o DNA alvo [49]. A sonda emite fluorescência cuja intensidade aumenta na proporção de produto amplificado [49]. Existem variações nos formatos das sondas que incluem as sondas TaqMan, sondas FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e *molecular beacon* [49].

Um das principais vantagens desta técnica é a sua elevada sensibilidade, possibilitando a deteção de uma única unidade formadora de colónias (UFC). No entanto, em algumas situações esta vantagem pode dificiltar a decisão em termos de significado clínico [34, 49]. Uma desvantagem é a possibilidade de falsos positivos por contaminação com DNA de fontes exógenas (*carry-over* de produtos amplificados de reações anteriores através dos reagentes, microtubos, pipetas ou superfícies) [49] . Outra desvantagem, é a distinção entre microganismos mortos, viavéis e não viavéis [34].

Resultados falsamente negativos também podem ocorrer por insuficiente volume de amostra [49], presença de nucleases [34], por inadequada remoção dos inibidores da Taq polimerase [34] ou por baixa recuperação de DNA na extração [49].

Em suma, a PCR é usualmente considerada como um bom método para a deteção de bactérias, sendo simples, rápida, sensível e específica [50]. A PCR tem vantagens, quando comparada com os métodos tradicionais de identificação, mas deve sempre ser vista como uma metodologia complementar para ser empregue em situações específicas, sendo que a sua relação custo-eficácia ainda não permite a sua utilização rotineira em muitos diagnósticos microbiológicos [49].

1.6. Terapêutica

O tratamento das infeções por anaeróbios requerem muitas vezes, para além da administração de antibioterapia apropriada, drenagem e/ou desbridamento dos tecidos desvitalizados ou resseção cirúrgica [16, 20, 33, 37]. Devido à importância dos anaeróbios na medicina, a indústria farmacêutica tem continuado o desenvolvimento de agentes terapêuticos cujo espectro inclua atividade tanto para bactérias aeróbias como para anaeróbias [6] devido às infeções mistas [16, 37].

A terapêutica inicial é necessariamente empírica, já que podem levar vários dias a obter uma informação definitiva do(s) agente(s) causal(ais) [16, 23, 36]. No entanto, a terapêutica empírica aumenta os custos e a probabilidade de complicações iatrogénicas associadas a tratamentos desnecessários e aumento nas resistências [49]. Para esta terapêutica há que ter em consideração a natureza da infeção, a microbiota pode ter sido modificada devido à infeção, outras patologias, o uso prévio de antibióticos (profilaxia ou terapia), a falta

de espectro do tratamento para anaeróbios e aos padrões de resistência aos antimicrobianos do local [16].

Quatro grupos de antibióticos são ativos contra a maioria dos anaeróbios com importância clínica, como os nitroimidazois, os carbapenemos, o cloranfenicol e os β-lactâmicos em combinação com inibidores das β-lactamases [16, 20]. Estudos recentes documentaram um aumento da resistência aos antibióticos tradicionais anti-anaeróbios, como a clindamicina, o metronidazol, os carbapenemos [40], os β-lactâmicos, os macrólidos e as tetraciclinas [36]. Temos como exemplo o grupo *B. fragilis*, que no início de 1980 apresentava uma resistência de 6% à clindamicina mas em 2004 a percentagem era de 31,6% [40]. Estes aumentos nas resistências podem ter implicações clínicas importantes, levando à falha dos tratamentos e a um aumento da mortalidade [23, 40, 51].

Em grande parte dos laboratórios os testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) para anaeróbios são limitados e por vezes inexistentes na rotina básica [6, 33, 37]. A realização do TSA em todos os isolados anaeróbios não é, inclusivamente recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [51]. As realidades económicas e o uso ponderado de recursos incutem que se deve considerar cuidadosamente a realização de TSA por rotina [36]. Os TSA estão indicados em casos de infeção grave, como abcessos cerebrais, bacteriémia ou endocardite, em caso de infeções que requerem tratamento prolongado como osteomielite ou infeções prostésicas e no caso de falhas prévias aos antimicrobianos [16]. Também deve ser considerada a realização do TSA quando se está perante microrganismos com diferentes padrões de suscetibilidade (grupo *B. fragilis*), quando os padrões não são bem conhecidos, bactérias que se sabem serem especialmente virulentas ou quando isolados em cultura pura [36].

1.7. Objetivos

A correta identificação das bactérias anaeróbias envolvidas nos processos infeciosos é fundamental para a avaliação da doença e para a implementação do tratamento adequado.

A utilização de técnicas de PCR na deteção de microrganismos tem revelado inúmeras vantagens nomeadamente, o aumento de sensibilidade e especificidade, a diminuição do tempo de resposta e a possibilidade de utilização de amostras após o início da antibioterapia.

O presente trabalho tem como objetivo implementar protocolos de PCRtr para a deteção de dois dos géneros mais prevalentes nas infeções por anaeróbios, *Prevotella* e *Bacteroides*, e para a espécie mais prevalente *Bacteroides fragilis*.

Pretende-se assim:

- Elaborar protocolos para a deteção dos géneros *Prevotella* e *Bacteroides* e da espécie *Bacteroides fragilis*;
- Aplicar estes protocolos a amostras clínicas;
- Comparar os resultados com os obtidos pelo método de referência – cultura;
- Avaliar as vantagens e limitações da técnica de PCRtr para a deteção de *Bacteroides* e *Prevotella* em amostras clínicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira fase do presente trabalho foi necessário implementar os protocolos de PCRtr para a deteção dos géneros *Prevotella* e *Bacteroides* e da espécie *Bacteroides fragilis.* Numa segunda fase, o protocolo foi aplicado às amostras clínicas. Para melhor expor todo o processo, o material e métodos vai ser dividido em fase A e fase B, correspondente às etapas anteriormente referidas.

Fase A – Implementação dos protocolos de PCRtr

2.1. Amplificação por PCRtr

A seleção dos *primers* e sondas para o gene 16S rRNA dos géneros *Prevotella*, *Bacteroides* e da espécie *Bacteroides fragilis*, foi efetuada após revisão bibliográfica da literatura, tendo sido utilizados os artigos das referências 60, 61 e 21, para *Prevotella*, *Bacteroides* e *Bacteroides fragilis* respetivamente.

Após a fase de escolha, as sequências foram alvo de análise no BLAST (*Basic local alignment search tool*) para verificação da especificidade teórica, tendo sido selecionados os *primers* e sondas discriminados na tabela 5.

Para o género *Prevotella* e *Bacteroides* foram utilizadas as sondas TaqMan com o *quencher* BHQ na extremidade 3' e com o fluoróforo 6FAM na extremidade 5'. Para a espécie *Bacteroides fragilis* foi utilizada a sonda TaqMan com o *quencher* TAMRA na extremidade 3' e com o fluoróforo 6FAM na extremidade 5'. O *quencher* TAMRA (*Tetramethylrhodamine*) é fluorescente ao contrário do BHQ (*Black hole quencher*).

A técnica de PCR foi realizada no sistema de deteção ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

Tabela 5 - Sequências de *primers* e sondas utilizadas para deteção dos géneros *Prevotella*, *Bacteroides* e da espécie *Bacteroides fragilis*.

***Primers* e Sondas**	**Sequência (5' – 3')**	**Produto amplificado (pb)**
Prevotella		153
PrevsppF	ACCAgCCAAgTAgCgTgCA	
PrevsppR	TggACCTTCCGTATTACCgC	
Sonda	(FAM)AATAAggACCggCTAATTCCgTgCCAg(BHQ-1)	
Bacteroides		106
BactsppF	gggTTTAAAgggAgCgTAgg	
BactsppR	CTACACCACgAATTCCgCCT	
Sonda	(FAM)TAAgTCAgTTgTgAAAgTTTgCggCTC(BHQ-1)	
B. fragilis		167
BfragForward	TCRggAAgAAAgCTTgCT	
BfragReverse	CATCCTTTACCggAATCCT	
Sonda	(FAM)ACACgTATCCAACCTgCCCTTTACTCg(TAMRA)	

Para a deteção de *Prevotella*, a reação de PCRtr foi realizada num volume total de 20 µL contendo 5 µL de DNA extraído, enzima TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems), PrevsppF e PrevsppR [0,3 µM] (Invitrogen) e sonda [0,2 µM] (Stabvida). Todas as reações foram efetuadas em duplicado. As concentrações de *primers* e sonda foram alvo de otimização.

Para a deteção de *Bacteroides*, a reação de PCRtr foi realizada num volume total de 25 µL contendo 5 µL de DNA extraído, enzima TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems), BactsppF e BactsppR [0,6 µM] (Invitrogen) e sonda [0,2 µM] (Stabvida). Todas as reações foram efetuadas em duplicado. A quantidade de DNA foi padronizada com o valor utilizado na PCRtr para deteção de *Prevotella*.

Para a deteção da espécie *Bacteroides fragilis* a reação de PCRtr foi realizada num volume total de 25 µL contendo 5 µL de DNA extraído, enzima TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems), BfragF e BfragR [0,3 µM] (Invitrogen) e sonda [0,2 µM] (Stabvida). Todas as reações foram efetuadas em duplicado. A

quantidade de DNA foi padronizada com o valor utilizado na PCRtr para deteção de *Prevotella*.

As condições de amplificação para cada reação encontram-se descritas nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Condições da reação de amplificação para o género *Prevotella*.

	Nº de ciclos	**Duração**	**Temperatura**
Ativação da uracil-N-glicosilase	1	2 minutos	50 ºC
Desnaturação inicial	1	10 minutos	95 ºC
Desnaturação	40	15 segundos	95 ºC
Hibridação e elongação	40	1 minuto	60 ºC

Tabela 7 - Condições da reação de amplificação para o género *Bacteroides*.

	Nº de ciclos	**Duração**	**Temperatura**
Ativação da uracil-N-glicosilase	1	2 minutos	50 ºC
Desnaturação inicial	1	10 minutos	95 ºC
Desnaturação	50	30 segundos	95 ºC
Hibridação e elongação	50	45 segundos	60 ºC

Tabela 8 - Condições da reação de amplificação para a espécie *Bacteroides fragilis*.

	Nº de ciclos	**Duração**	**Temperatura**
Ativação da uracil-N-glicosilase	1	2 minutos	50 ºC
Desnaturação inicial	1	10 minutos	95 ºC
Desnaturação	40	15 segundos	95 ºC
Hibridação e elongação	40	1 minuto	63 ºC

Em todos os ensaios foi utilizado um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo positivo para a PCRtr de *Bacteroides* e de *Bacteroides fragilis* foi DNA [10

ng/µL] de *Bacteroides fragilis* de um isolado clínico; para a PCRtr de *Prevotella* foi utilizado DNA [10 ng/µL] de *Prevotella melaninogenica* (ATCC25845). Para o controlo negativo usou-se água ultra-pura, Dnase e RNase livre.
Os DNAs dos controlos positivos foram extraídos com o kit *InstaGene*™ *Matrix* (Bio-Rad), ver 2.2.

2.1.1. Avaliação da especificidade analítica dos *primers* e sondas

Para o estudo da especificidade analítica dos *primers* e sondas foram utilizados DNAs [10 ng/µL] de várias espécies bacterianas anaeróbias facultativas e estritas, usualmente encontradas em infeções polimicrobianas [17], extraídos de isolados clínicos (tabela 9).
Os DNAs foram extraídos com o *kit InstaGene*™ *Matrix* (Bio-Rad), ver 2.2.

Tabela 9 - Espécies bacterianas utilizadas no estudo da especificidade analítica dos *primers* e sondas.

Anaeróbios estritos
Bacteroides fragilis
Bacteroides stercoris
Bacteroides thetaiotaomicron
Clostridium perfringens
Finegoldia magna
Peptostreptococcus anaerobius
Prevotella buccae
Prevotella disiens
Prevotella intermedia
Prevotella melaninogenica
Prevotella oralis

Anaeróbios facultativos
Enterococcus faecalis
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis

2.1.2. Avaliação da sensibilidade analítica da PCRtr

Para a avaliação da sensibilidade analítica da PCRtr dos géneros *Bacteroides* e *Prevotella* foram testadas várias concentrações de DNA dos controlos positivos, culminado na concentração correspondente a uma unidade genómica (UG) (tabela 10).

Tabela 10 - Concentrações de DNA testadas no estudo da sensibilidade da PCRtr.

Concentrações DNA	***Bacteroides fragilis*** (isolado clinico)	***Prevotella melaninogenica*** (ATCC 25845)
	5,7 ng/µL	1,64 ng/µL
	57 pg/µL	164 pg/µL
	5,7 pg/µL	16,4 pg/µL
	0,57 pg/µL	1,64 pg/µL
	57 fg/µL	164 fg/µL
	5,7 fg/µL*	16,4 fg/µL
	-	1,64 fg/µL*

* Unidade genómica

Para calcular a UG recorreu-se às sequências completas depositadas no *GenBank* (tabela 11 e 12) e efetuou-se a média dos tamanhos dos genomas. Para a determinação da UG aplicou-se a seguinte fórmula:

$$m = \left[n \right] \left[1.096e\text{-}21 \ \frac{g}{bp} \right]$$

m = massa
n = tamanho do genoma (bp)
$e^{-21} = x10^{-21}$.

Tabela 11 - Genomas de *Bacteroides fragilis*.

Designação	Número de acesso	Tamanho (pb)
Bacteroides fragilis NCTC9343	CR626927.1	5 205 140
Bacteroides fragilis estirpe BOB25	CP011073.1	5 282 232
Bacteroides fragilis YCH46	AP006841.1	5 277 274
Bacteroides fragilis BFBE1	LN877293.1	5 188 967
Média do tamanho do genoma		**5 238 403**

Tabela 12 - Genomas de *Prevotella melaninogenica*.

Designação	Número de acesso	Tamanho (pb)
ATCC 25845	CP002123.1	1 371 874
ATCC 25845	CP002122.1	1 796 408
Média do tamanho do genoma		**1 584 141**

2.2. Extração de DNA genómico total de cultura pura

Foi realizada a extração de DNA, a partir de cultura pura utilizando o *kit InstaGene*™ *Matrix* (Bio-Rad), para os controlos e para o estudo da especificidade e sensibilidade dos *primers* e sondas. Executou-se o protocolo do fabricante com algumas modificações, assinaladas a negrito:

- Retirar **algumas colónias** com uma ansa de **10 µL** e colocar num microtubo de 1,5 mL esterilizado, adicionar **500 µL** de água ultra-pura;
- Agitar no vortéx até completa homogeneização;
- Centrifugar 75 segundos a 12 000 rpm e à temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com **100 µL** de *InstaGene*™ *Matrix* (Bio-Rad), previamente homogeneizado;
- Incubar 30 minutos a 56 ºC;
- Agitar no vortéx durante 10 segundos;

- Incubar 8 minutos a 100 ºC;
- Agitar no vortéx;
- Centrifugação 3 minutos a 12 000 rpm à temperatura ambiente;
- Recolher o sobrenadante e armazenar o DNA extraído a -20 ºC.

2.3. Quantificação de DNA por espetrofotometria

A quantificação do DNA das espécies bacterianas utilizadas como controlo positivo e para o estudo da sensibilidade e especificidade foi efetuada por espectrofotometria a 260 nm. Para o cálculo da concentração aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\textbf{Concentração de DNA} = \frac{\textbf{D.O. 260 x 50 x Vt}}{\textbf{V DNA}}$$

D.O. 260 = Densidade ótica a 260nm
Vt = Volume total
VDNA = volume de extracto

Fase B – Processamento de amostras

2.4. Estudo das amostras clínicas

Entre Agosto e Dezembro de 2015 foram recolhidas 103 amostras no Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO), constituído pelo Hospital de Egas Moniz (HEM), Hospital de Santa Cruz (HSC) e Hospital de São Francisco Xavier (HSFX). Na tabela 13 encontra-se a distribuição dos diferentes tipos de amostras pelos três hospitais. Das 103 amostras clínicas enviadas ao laboratório de microbiologia do HEM para pesquisa de bactérias anaeróbias, 60 tratavam-se de amostras purulentas e 43 de líquidos biológicos.

As amostras foram processadas no HEM segundo o fluxograma descrito no Anexo I.

Tabela 13 - Distribuição das amostras biológicas por tipo de produto e hospital.

	HEM	**HSC**	**HSFX**	**Total**
Amostras purulentas	24	13	23	**60**
Líquidos biológicos	4	18	21	**43**
Total	28	31	44	**103**

Todas as amostras analisadas foram colhidas em meio de transporte para anaeróbios (*Portagerm Amies Agar*, bioMérieux) e armazenadas a 4 ºC até se proceder à extração de DNA.

2.4.1. Processamento das amostras

Para otimização da técnica de extração utilizaram-se duas *pools* de amostras positivas de líquidos biológicos e duas *pools* de amostras negativas purulentas, adicionando-se a este última uma concentração conhecida de *Bacteroides fragilis* (0,5 da escala de McFarland equivalente a 10^8 CFU/mL). Nas *pools* dos líquidos biológicos testaram-se 2 *kits* e nas *pools* de amostras purulentas testou-se 1 *kit* e 3 variações do protocolo.

2.4.2. Extração de DNA genómico total de líquidos biológicos

Para a extração de DNA dos líquidos biológicos, tais como bílis, líquidos sinoviais e pericárdicos, foi utilizado o *kit* comercial *Genomic DNA extraction mini kit* (Real Genomics). O protocolo executado foi o referente a amostras de sangue, pelo que foi necessário proceder à sua otimização para o presente trabalho (as alterações encontram-se a negrito):

1. Pipetar 300 µL de amostra para um microtubo de 1,5 mL esterilizado. **Em caso de pouca quantidade de amostra, adicionar ao meio de transporte água ultra-pura até perfazer os 300 µL e agitar bem**;
2. **Centrifugar 3 minutos a 12 000 x *g*;**

3. **Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 500 µL** de tampão RBC;
4. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugar 2 minutos a **10 000 x *g***;
5. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 200 µL de tampão RBC, 200 µL de tampão GB e 20 µL de proteinase K (10mg/mL);
6. Agitar vigorosamente no vortéx durante **30 segundos**. **Fazer um *spin***;
7. Incubar **uma hora a 70ºC**. Ao longo da incubação, agitar o microtubo;
8. **No final da incubação agitar no vortéx. Fazer um *spin*;**
9. Adicionar 200 µL de etanol absoluto e homogeneizar fortemente no vortéx 10 segundos. **Fazer um *spin***;
10. Colocar a coluna num tubo de recolha e pipetar o lisado, obtido previamente, no centro da coluna;
11. Centrifugar 5 minutos a 10 000 x *g*;
12. Descartar o filtrado e adicionar 400 µL de tampão W1;
13. Centrifugar **1 minuto** a 10 000 x *g*;
14. Descartar o filtrado e adicionar 600 µL de tampão *Wash*;
15. Centrifugar **1 minuto** a 10 000 x *g*;
16. Descartar o filtrado e centrifugar novamente a coluna vazia 3 minutos a 10 000 x *g* de forma a secar a membrana, evitando deste modo o *carry-over* de tampão *Wash*;
17. Colocar a coluna num microtubo de 1,5 mL esterilizado e adicionar **50 µL** de tampão de eluição previamente aquecido a 70 ºC;
18. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente, para a membrana de sílica absorver o tampão adicionado;
19. Centrifugar **2 minutos** a 10 000 x *g*;
20. **Efetuar uma segunda eluição com os 50µl do eluído do passo anterior (pré-aquecido a 70 ºC);**
21. **Incubar 5 minutos à temperatura ambiente;**
22. **Centrifugar 3 minutos a 12 000 x *g*;**
23. Armazenar o DNA eluído a -20 ºC.

2.4.3. Extração de DNA genómico total de amostras purulentas

Para extração de DNA das amostras purulentas, como exsudados profundos, de feridas cirúrgicas e pús de abcessos, utilizou-se o *kit* comercial *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN), seguindo o protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection* com algumas modificações (assinaladas a negrito):

1. Pipetar **300 µL de amostra** para um microtubo de 1,5 mL esterilizado;
2. **Centrifugar 3 minutos a 10 000 x *g*;**
3. **Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com 400 µL** de tampão de lise ASL;
4. Agitar fortemente no vortéx 30 segundos ou até as amostras estarem completamente homogeneizadas. **Fazer *spin***;
5. Incubar **10 minutos a 95 ºC**;
6. Agitar fortemente no vortéx **30 segundos**. Fazer um *spin*;
7. Supressão dos itens referentes à remoção da parte inorgânica e dos inibidores das fezes;
8. Adicionar **diretamente** 15 µL de proteinase K e 200 µL de tampão AL. Agitar vigorosamente no vortéx **30 segundos**;
9. Incubar **uma hora** a 70 ºC. **Fazer *spin***;
10. Adicionar 200 µL de etanol absoluto e agitar fortemente no vortéx 15 segundos;
11. Colocar toda a suspensão na coluna preparada com o tubo de recolha;
12. Centrifugar 1 minuto a 16 000 x *g*;
13. Colocar a coluna num novo tubo de recolha e adicionar 500 µL de solução de lavagem AW1;
14. Centrifugar 1 minuto a 16 000 x *g*;
15. Colocar a coluna num novo tubo de recolha e adicionar 500 µL de solução de lavagem AW2;
16. Centrifugar 3 minuto a 16 000 x *g*;
17. Colocar um novo tubo de recolha e centrifugar a coluna vazia 1 minuto a 16 000 x *g*, de modo a diminuir a possibilidade de *carry-over* da solução de lavagem AW2;

18. Colocar a coluna num microtubo de 1,5 mL esterilizado e adicionar **50 µL tampão AE previamente aquecido a 70 ºC;**
19. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente para a membrana de sílica absorver o tampão;
20. **Efetuar uma segunda eluição com os 50 µl de extraído eluído no passo anterior (pré-aquecido a 70º C);**
21. **Incubar 5 minutos à temperatura ambiente;**
22. Centrifugar **3 minutos** a 16 000 x *g*;
23. Armazenar o DNA eluído a -20 ºC.

2.5. PCRtr das amostras clínicas

Foram aplicados os protocolos otimizados descritos em 2.1 para a deteção de *Bacteroides* e *Prevotella* aos extraídos das amostras clínicas.

2.5.1. Critérios de aceitação dos resultados da PCRtr

Para a deteção dos géneros *Prevotella* e *Bacteroides* nas amostras clínicas, foi considerado [52]:

- Como positivas as reações de PCRtr com Ct igual ao limite de deteção mais 2 de Ct – *Prevotella* até 39,60 e *Bacteroides* até 39,11;
- Como negativas as reações $3 \leq Ct \leq 15$;
- Só foram aceites duplicados que não diferiram mais de 2 de Ct;
- Todos os resultados não concordantes foram confirmados com nova extração e nova sessão de PCRtr (há exceção de um por falta de amostra).

2.6. Comparação dos resultados do método de referência (cultura) com os da PCRtr

Para esta comparação utilizamos os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

Tabela 14 - Resultados considerando o método de referência e o teste.

		Método de referência	
		Positivo	Negativo
Teste	Positivo	Verdadeiro positivo (A)	Falso positivo (B)
	Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro negativo (D)

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{(A + C)}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{D}{(B + D)}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{A}{(A + B)}$$

$$\text{Valor preditivo negatico} = \frac{D}{(C + D)}$$

3. Resultados e Discussão

Fase A – Implementação dos protocolos de PCRtr

3.1. Amplificação por PCRtr

Após a realização do estudo da especificidade teórica (BLAST), os resultados obtidos demonstraram que, para o género *Prevotella* o *primer foward* apresentava homologia com sequências de outros géneros (*Hallella* e *Alloprevotella*), e o *primer reverse* e a sonda com os géneros *Alloprevotella* e *Xylanibacter*.

Para o género *Bacteroides*, o *primer foward* mostrou homologia com sequências de outros géneros (*Prevotella*, *Niabella*, *Niastella* e *Pedobacter*) e o *primer reverse* com os géneros *Prevotella* e *Porphyromonas*. No entanto, em relação à sequência da sonda, verificou-se que a especificidade aumentava, emparelhando unicamente com o género *Bacteroides*. Para *Bacteroides fragilis*, os *primers* e a sonda mostraram homologia exclusivamente com esta espécie. (Anexo II).

3.1.1. Otimização da PCRtr para o género *Prevotella*

Como na referência utilizada para a deteção de *Prevotella* não se encontrava discriminada a concentração de *primers* e sonda utilizados, testaram-se os *primers* a [0,3 µM] e a [0,6 µM] e a sonda a [0,2 µM] e a [0,4 µM], utilizando-se o controlo positivo (*P. melaninogenica* ATCC25845). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 - Concentrações de *primers* e sonda testadas para o género *Prevotella*.

Concentração *primers* + sonda	**Resultados (Ct)**
0,3 µM + 0,2 µM	Positivo (17,81 ; 17,63)
0,6 µM + 0,4 µM	Positivo (17,82 ; 17,09)

Com este resultado optou-se pela concentração 0,3 µM + 0,2 µM, por não apresentar diferença no valor de Ct em relação à outra concentração testada.

3.1.2. Otimização da quantidade de DNA para o género *Bacteroides* e espécie *Bacteroides fragilis*

Para padronizar a quantidade de DNA utilizada nas três reações de PCRtr, e verificar que não existia inibição da reação por excesso de DNA, testaram-se os volumes de 2,5 µL (referenciado em 61 e 21) e 5 µL (utilizado na reação de *Prevotella*). Na reação utilizou-se o controlo positivo (*Bacteroides fragilis*). Os resultados encontram-se descritos na tabela 16.

Tabela 16 - Resultados da amplificação do género *Bacteroides* e espécie *Bacteroides fragilis*.

Volume DNA	Deteção	Resultado (Ct)
2,5 µL	*Bacteroides*	Positivo (18,08 ; 17,91)
5 µL		Positivo (16,56 ; 16,73)
2,5 µL	*Bacteroides fragilis*	Negativo
5 µL		Negativo

Os resultados obtidos na deteção de *Bacteroides fragilis* mostraram que, com as concentrações referidas em 21, não ocorreu amplificação. Desta forma, foram testadas outras concentrações de *primers* [0,2 µM + 100 µM (puro)] e sonda [0,2 µM + 0,4 µM + 0,8 µM + 100 µM (puro)]. Como o problema se manteve, após várias tentativas, optou-se por abandonar a deteção desta espécie.

Os resultados obtidos na reação de *Bacteroides* mostram não existir inibição, pelo que, se optou por continuar o estudo utilizando 5 µL de DNA alvo.

3.1.3. Estudo da especificidade analítica de *primers* e sondas para os géneros *Prevotella* e *Bacteroides*

Os resultados da avaliação da especificidade analítica dos *primers* e sonda para os dois géneros encontram-se na tabela 17.

Tabela 17 - Resultados do estudo da especificidade analítica de *primers* e sondas para o género *Prevotella* e *Bacteroides*.

	DNA [10 ng/µL]	**Resultado da PCRtr (Ct)**	
		Prevotella	***Bacteroides***
Anaeróbios estritos	*Bacteroides fragilis*	Negativo	Positivo (18,08 ; 17,91)
	Bacteroides stercoris	Negativo	Positivo (23,98 ; 23,03)
	Bacteroides thetaiotaomicron	Negativo	Positivo (18,43 ; 18,41)
	Clostridium perfringens	Negativo	Negativo
	Finegoldia magna	Negativo	Negativo
	Peptostreptococcus anaerobius	Negativo	Negativo
	Prevotella buccae	Positivo (19,70 ; 18,88)	Negativo
	Prevotella disiens	Positivo (26,56 ; 26,04)	Negativo
	Prevotella intermedia	Positivo (19,73 ; 19,78)	Negativo
	Prevotella melaninogenica	Positivo (24,09 ; 24,22)	Negativo
	Prevotella oralis	Positivo (17,36 ; 17,56)	Negativo
Anaeróbios facultativos	*Enterococcus faecalis*	Negativo	Negativo
	Escherichia coli	Negativo	Negativo
	Klebsiella pneumoniae	Negativo	Negativo
	Staphylococcus aureus	Negativo	Negativo
	Staphylococcus epidermidis	Negativo	Negativo

Verificou-se que, com os *primers* e sonda para o género *Prevotella*, não houve reação de amplificação nem com as 6 espécies bacterianas anaeróbias estritas nem com as 5 espécies anaeróbias facultativas, mas houve amplificação com as 5 espécies testadas pertencentes ao género *Prevotella*.

Comprovou-se que, com os *primers* e sonda para o género *Bacteroides* não existiu amplificação com o DNA das 8 espécies bacterianas anaeróbias estritas nem com as 5 espécies anaeróbias facultativas. Apenas se verificou amplificação com as 3 espécies de *Bacteroides*.

Desta forma, confirmou-se a especificidade analítica dos *primers* e sondas para os dois géneros, uma vez que não se verificou amplificação com as espécies testadas e que são usualmente encontradas em infeções polimicrobianas, permitindo desta forma a sua utilização no presente estudo [53].

3.1.4. Estudo da Sensibilidade analítica de *primers* e sondas para os géneros *Prevotella* e *Bacteroides*

Os resultados da avaliação da sensibilidade analítica utilizando os *primers* e sondas para o género *Prevotella* e para o género *Bacteroides* apresentam-se nas tabelas 18 e 19, respetivamente.

Tabela 18 - Estudo da sensibilidade da PCRtr para o género Prevotella.

[DNA]	Resultado (Ct)
1,64 ng/µL (1000 000 UG)	Positivo (19,31 ; 19,25)
164 pg/µL (100 000 UG)	Positivo (22,93 ; 22,95)
16,4 pg/µL (10 000 UG)	Positivo (29,01 ; 27,76)
1,64 pg/µL (1000 UG)	Positivo (31,75 ; 31,68)
164 fg/µL (100 UG)	Positivo (36,01 ; 36,42)
16,4 fg/µL (10 UG)	Positivo (39,44 ; 39,75)
1,64 fg/µL (1 UG)	Negativo

Obteve-se amplificação até à última diluição com [16,4 fg/ µL] equivalente a 10 UG, com uma média de Ct de 39,60 em 40 ciclos, verificando-se desta forma uma boa sensibilidade.

Tabela 19 - Estudo da sensibilidade da PCRtr para o género *Bacteroides*.

[DNA]	Resultado (Ct)
5,7 ng/µL (UG) (1000 000 UG)	Positivo (17,33 ; 17,32)
57 pg/µL (10 000 UG)	Positivo (25,00 ; 24,91)
5,7 pg/µL (1000 UG)	Positivo (29,30 ; 29,29)
0,57 pg/µL (100 UG)	Positivo (33,73 ; 33,77)
57 fg/µL (10 UG)	Positivo (34,87 ; 34,81)
5,7 fg/µL (1 UG)	Positivo (37,19 ; 37,06)

Para o género *Bacteroides* houve amplificação até à menor diluição, correspondente a uma unidade genómica, com uma média de Ct de 37,13 em 50 ciclos. Confirmou-se desta forma uma elevada sensibilidade.

Fase B – Processamento de amostras

3.2. Extração de DNA genómico total de líquidos biológicos

Com o objetivo de perceber a capacidade de recuperação de DNA em amostras de líquidos biológicos, testaram-se 2 *kits* de extração diferentes (*JetQuick blood and cell culture DNA* – Genomed; e o *Genomic DNA extraction mini kit* – Real Genomics). Utilizaram-se duas amostras selecionadas de entre as amostras positivas para *Prevotella* por cultura (amostra A e B). Os resultados da PCRtr são apresentados tabela 20.

Tabela 20 - Resultados da PCRtr para o género *Prevotella*.

	Resultado (Ct)	
	JetQuick blood and cell culture DNA	*Genomic DNA extraction mini kit*
Amostra A	Negativo	Positivo (37,94 ; 37,68)
Amostra B	Positivo (25,36 ; 25,64)	Positivo (22,22 ; 22,29)

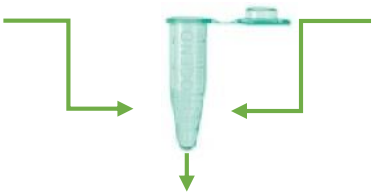
Verificou-se que o uso do *Genomic DNA extraction mini kit* permitiu a recuperação de DNA em ambas as amostras ao contrário do outro *kit* testado, para além de que, se recuperou maior quantidade de DNA na amostra B (menor Ct).

Desta forma selecionou-se este *kit* para a extração das amostras dos líquidos biológicos.

3.3. Extração de DNA genómico total de amostras purulentas

Com o objetivo de otimizar o protocolo de extração para as amostras purulentas, efetuou-se a extração de uma *pool* (abaixo indicado), com 3 variantes do protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection* do *Genomic DNA extraction mini kit*, (QIAGEN). Nas 3 variações suprimiram-se os passos correspondentes à remoção de inibidores presentes nas amostras fecais. Na tabela 21 apenas se encontram mencionadas as alterações ao referido protocolo.

100 µL *pool* (amostras purulentas negativas)



100 µL suspensão *B. fragilis* (0,5 McFarland)

QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN (protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection*) com três variantes: A, B e C

Tabela 21 - Variantes do protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen detection*.

	Volume (µL)		**Tempo de incubação/Temperatura**	
	Amostra	Tampão ASL	Lise com tampão ASL	Lise com tampão AL + Proteinase K
Variação A	200	700	5 minutos/70 ºC	10 minutos/70 ºC
Variação B	300	400	10 minutos/ 70ºC	30 minutos/70 ºC
Variação C	300	400	10 minutos / 95 ºC	1 hora/70 ºC

A PCRtr para deteção de *Bacteroides* apresentou os seguintes resultados (tabela 22).

Tabela 22 - Resultados da PCRtr (*Bacteroides*) das 3 variações ao protocolo original.

	Resultado (Ct)
Variação A	Positivo (25,28 ; 25,11)
Variação B	Positivo (26,49 ; 26,49)
Variação C	Positivo (19,88 ; 19,80)

Com os resultados obtidos selecionou-se como protocolo de extração para as amostras purulentas a variação C, uma vez que com esta variação se recuperou maior quantidade de DNA (menor Ct). A temperatura na primeira lise e o do tempo de incubação no segundo passo de lise parecem condicionar a eficácia da extração neste tipo de amostras.

3.4. Resultados da PCRtr

Resultados da cultura de anaeróbios (HEM)

Das 103 amostras utilizadas neste estudo, 13 foram positivas para *Bacteroides* e 14 para *Prevotella*. Das amostras positivas, 3 eram líquidos biológicos e 23 eram amostras purulentas (tabela 23).

Tabela 23 – Resultados positivos por cultura (HEM).

	Bacteroides	***Prevotella***	**Total**
Líquidos biológicos	1	2	3
Amostras purulentas	12	11	23
Total	13	14	

Resultados da PCRtr

Das 103 amostras analisadas por PCRtr, obtiveram-se 19 amostras com amplificação para o género *Bacteroides*, e 14 para o género *Prevotella* (tabela 24).

Tabela 24 – Resultados positivos da PCRtr.

	Bacteroides	***Prevotella***	**Total**
Líquidos biológicos	5	2	7
Amostras purulentas	14	12	26
Total	19	14	33

Nas tabelas 25 e 26 discriminam-se as amostras positivas por PCRtr.

Tabela 25 – Resultados positivos para o género *Prevotella* por PCRtr.

Número da amostra	**Tipo de amostra**	**Ct**	**Média Ct**	**Resultado**
ME113789	Amostra purulenta	33,27 ; 32,89	33,08	Positivo
ME113805		33,13 ; 32,66	32,90	Positivo
ME114389		39,53 ; 39,44	39,49	Positivo
ME116860		33,25 ; 33,20	33,23	Positivo
ME118115		22,01 ; 21,68	21,85	Positivo
ME118282		39,78 ; 38,89	39,34	Positivo
MS87914		24,06 ; 26,02	25,04	Positivo
MS88938		26,11 ; 26,74	26,43	Positivo
MS90753		27,17 ; 27,72	27,45	Positivo
MX147080	Líquido biológico	39,54 ; 37,68	38,81	Positivo
MX152531		24,51 ; 24,45	24,48	Positivo
MX153608	Amostra purulenta	29,71 ; 29,20	29,46	Positivo
MX155950		27,47 ; 27,84	27,66	Positivo
MX156490		28,20 ; 28,83	28,52	Positivo

Analisando a tabela verificamos que os Ct variaram entre 21,85 e 39,49 e que respeitam os critérios de validação definidos no ponto 2.5.1. pelo que foram considerados como positivas.

Tabela 26 – Resultados para o género *Bacteroides* por PCRrt.

Número da amostra	Tipo de amostra	Ct	Média Ct	Resultado
ME113602	Amostra purulenta	39,29 ; 38,36	38,83	Positivo
ME114389		34,83 ; 35,02	34,93	Positivo
ME116940		27,58 ; 28,15	27,87	Positivo
MS88938		22,56 ; 22,57	22,57	Positivo
MS90753		22,61 ; 23,36	22,99	Positivo
MX147080	Líquido biológico	20,57 ; 20,63	20,60	Positivo
MX147333	Amostra purulenta	35,91 ; 34,31	35,11	Positivo
MX149485	Líquido biológico	38,07 ; 39,01	38,54	Positivo
MX149766	Amostra purulenta	25,10 ; 25,88	25,49	Positivo
MX150576		26,24 ; 26,53	26,39	Positivo
MX152531	Líquido biológico	28,20 ; 30,68	29,44	Positivo
MX153258	Amostra purulenta	33,28 ; 34,26	33,77	Positivo
MX153524		36,55 ; 38,11	37,83	Positivo
MX154125		39,81 ; 40,07	39,94	Negativo
MX154127		20,59 ; 20,40	20,50	Positivo
MX155437	Líquido biológico	41,14 ; 47,22	44,18	Negativo
MX155671	Amostra purulenta	31,09 ; 32,12	31,61	Positivo
MX156490		24,84 ; 24,35	24,60	Positivo
MX157028	Líquido biológico	38,19 ; 37,27	37,73	Positivo

Ao proceder à análise dos resultados verificamos que os Ct variam entre 20,50 e 44,18. Todos à exceção de dois (MX154125, Ct=39,94 e MX155437, Ct=44,18) respeitam os critérios de validação definidos no ponto 2.5.1 pelo que foram considerados como positivas. Estas duas amostram foram consideradas negativas por se encontrarem acima do limite de sensibilidade da técnica (1 UG; Ct= 39,13).

3.5. Comparação dos resultados do método de referência (cultura) com os da PCRtr

Tabela 27 – Comparação da cultura com a PCRtr para o género *Prevotella*.

	Cultura positiva	Cultura negativa	Total
PCR positiva	9	5	14
PCR negativa	4	85	89
Total	13	90	103

Tabela 28 – Comparação da cultura com a PCRtr para o género *Bacteroides*.

	Cultura positiva	Cultura negativa	Total
PCR positiva	10	9	19
PCR negativa	3	81	84
Total	13	90	103

Em relação à deteção de *Prevotella*, das 13 amostras positivas por cultura, 9 foram positivas por PCRtr, mostrando uma sensibilidade de 69%. Das 103 amostras, 85 foram negativas por cultura e PCRtr, revelando uma especificidade de 94%. Para o género *Bacteroides*, também com 13 amostras positivas por cultura, 10 foram positivas por PCRtr, mostrando uma sensibilidade de 77%. Das 103 amostras, 81 mostraram ser negativas por cultura e PCRtr, como uma especificidade de 90%. Podemos verificar que, a sensibilidade se encontra entre os 69% e 77% e a especificidade entre 90% e 94%. Os valores preditivos positivo e negativo foram calculados para a deteção dos dois géneros. No que diz respeito ao VPP, ele foi de 64% e 53%, para *Prevotella* e *Bacteroides* respetivamente. O VPN foi de 96% para *Prevotella* e *Bacteroides*. Podemos comparar estes valores com os de Boutaga e col., em que também foi comparada a cultura de anaeróbios e a deteção por PCRtr [54]. Neste estudo, obtiveram 91-99% de sensibilidade, 28-90% de especificidade, 71-98% de VPP e 71-97% de VPN

[54]. Num outro estudo de Boutaga e col., 2005 a sensibilidade foi de 100%, a especificidade de 94%, o VPP e o VPN foram 94% e 100% respetivamente [55]. Na deteção do género *Prevotella*, obtiveram-se 5 resultados negativos por cultura e positivos por PCRtr (presumidamente falsos positivos) e, na deteção de *Bacteroides*, obtiveram-se 9. Resultados negativos por cultura e positivos por PCRtr podem dever-se a reações cruzadas com outras bactérias, contaminação ou deteção de bactérias mortas ou não cultiváveis, problemas na colheita e transporte, como a hidratação necessária para manter a viabilidade das bactérias, falha no procedimento da cultura por anaerobiose, como a exposição ao O_2 antes de a amostra ser processada, escolha errada dos meios de cultura e problemas na manutenção da atmosfera de anaerobiose, podem ser responsáveis por resultados discordantes, neste caso falsamente negativos com a cultura [39, 56, 57, 52], levando à sugestão errada de que seriam falsos positivos com a biologia molécular. Em relação à contaminação, esta hipótese é ténue, já que foi tido em conta precauções para precaver este tipo de situações, para além de que não foi observada amplificação nos controlos negativos. Também podemos excluir a possibilidade de reações cruzadas com outras bactérias, já que foi testada a especificidade analítica de *primers* e sondas. Há que ter em consideração nestes casos, a formação de biofilme por múltiplas espécies, comum em feridas infetadas [53], uma vez que a formação de biofilme pode resultar em bactérias viáveis mas não cultiváveis, [53, 57]. Destes 14 resultados hipoteticamente falsos positivos, sabe-se que 8 dos doentes se encontravam sob antibioterapia aquando da colheita (Anexo III), sendo esta uma das grandes vantagens da utilização da PCRtr, pois permite a deteção de bactérias em amostras de pacientes sob antibioterapia [55, 56, 57]. Sabe-se também que, de entre as amostras negativas por cultura e positivas por PCR, foram isolados mas não identificados dois bacilos de Gram negativo pigmentados (detetado por PCRtr, uma amostra para *Prevotella* e outra para *Bacteroides*). Também nos supostos falsos positivos, há que ter presente as limitações na identificação realizada por métodos rápidos e automáticos como os *cards* Vitek ANC (utilizado pelo HEM para identificação dos isolados). Um estudo realizado por Diane M. Citron, 2011, comparou a cultura com sequenciação 16rDNA, concluindo que 20% de espécies de *Bacteroides* e 36% de *Prevotella* não foram identificados, ou foram mal identificados [1]. Noutro estudo foram analisadas 20 estirpes de bacilos de Gram positivo, comparando a sequenciação

16rDNA com o Vitek ANI, e este último apenas identificou precisamente 2 estirpes em 20 [1]. Vários outros estudos mostram que a correta identificação, por parte dos *cards* Vitek ANC, varia entre 51% e 95%, deixando portanto espécies por identificar ou identificadas erroneamente [46, 48]. Os métodos convencionais de identificação são trabalhosos e demorados, e os *kits* rápidos comerciais de identificação são menos precisos que os métodos convencionais [2, 56].

Resultados presumivelmente falsos negativos (cultura positiva e PCRtr negativo) foram observados em 7 amostras, em que em 4 amostras não foi detetado o género *Prevotella* e em 3 amostras não foi detetado o género *Bacteroides*. Os "falsos negativos" podem dever-se à insuficiente homogeneização das amostras, baixo volume da mesma, problemas inerentes à reação de amplificação e inibição da reação por excesso de DNA ou presença de inibidores [34, 58]. Os supostos falsos positivos devido a problemas na reação foram excluídos visto ter-se verificado amplificação nos controlos positivos em todas as sessões de PCRtr. Pode notar-se que, das 43 amostras de líquidos biológicos analisadas, 3 foram positivas por cultura (1 *Bacteroides* e 2 *Prevotella*), sendo todos detetados por PCR. No entanto, pode-se observar, que todos os presumíveis falsos negativos (n= 7) são de amostras purulentas, o que poderá resultar na inibição da PCRtr, devido à grande quantidade de DNA humano presente nestas amostras [53, 56]. As amostras purulentas são também, muitas vezes, sanguinolentas resultando em quantidades significativas de inibidores da PCR como a hemoglobina [53]. Por outro lado, uma dessas amostras possuía pouco volume (+/- 50 µL), pelo que não foi possível fazer uma segunda extração. Este resultado negativo pode dever-se ao baixo volume de amostra. Ainda assim foi possível detetar-se os dois géneros neste tipo de amostras.

4. CONCLUSÃO

A correta identificação das bactérias anaeróbias envolvidas nos processos infeciosos é fundamental para a avaliação da doença e para a implementação do tratamento adequado [1]. No entanto, o método de referência (cultura) tem várias limitações como tratar-se de um método demorado, laborioso e com relativamente baixa sensibilidade [59, 54]. Em adição, estudos sugerem que um número significativo de anaeróbios com significado clínico não são detetados ou permanecem mal identificados devido apenas ao uso exclusivo das técnicas fenotípicas [34]. Isto pode dever-se aos complicados métodos convencionais de identificação, ao elevado custo e à falta de capacidade de fornecer resultados rápidos [34].

A utilização de técnicas de PCR na deteção de microrganismos tem revelado algumas vantagens, nomeadamente o aumento de sensibilidade e especificidade, a diminuição do tempo de resposta e a possibilidade de utilização de amostras após o início da antibioterapia.

O presente trabalho teve como objetivo implementar protocolos de PCRtr para a deteção de dois dos géneros mais prevalentes nas infeções por anaeróbios, *Prevotella* e *Bacteroides*, e para a espécie mais prevalente *Bacteroides fragilis*. Foram elaborados protocolos para a deteção dos géneros *Prevotella* e *Bacteroides* e da espécie *Bacteroides fragilis*. No entanto, após várias tentativas não foi possível identificar esta espécie por problemas ainda em investigação.

Uma das dificuldades sentidas no decorrer deste trabalho diz respeito à extração de DNA das amostras purulentas. Tal como referido por Tong e col.,2011, foi utilizado um *kit* para extração de fezes. No entanto, devido à natureza das amostras, foi difícil a homogeneização e a liquefação das mesmas.

Após otimização, os protocolos de deteção dos géneros *Prevotella* e *Bacteroides* foram aplicados a amostras clínicas, sendo por fim os resultados comparados com os obtidos pelo método de referência. Deste modo avaliou-se a sensibilidade, especificidade e o valor preditivo positivo e negativo. Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os de outros estudos, podemos concluir que, no que diz respeito à especificidade e

ao VPN, estes valores são próximos. No entanto, no que diz respeito à sensibilidade e o VPP, os resultados deste trabalho são baixos. No que se refere à sensibilidade, tal pode dever-se à dificuldade sentida na extração de DNA das amostras purulentas, como anteriormente referido. Relativamente ao VPP, é possível que alguns dos supostos falsos positivos para a técnica de PCRtr sejam, na verdade, falsos negativos com a cultura, uma vez que dos 14 falsos positivos obtidos, 8 foram de amostras de doentes que se encontravam sob antibioterapia aquando da colheita. Este facto realça uma das vantagens da utilização da PCRtr na deteção de bactérias anaeróbias, o seu uso após o início da antibioterapia.

Conclui-se que a técnica de PCRtr pode ser uma ferramenta útil na deteção de anaeróbios [56], sendo útil sobretudo em amostras obtidas durante a terapêutica com os antimicrobianos e no caso de culturas persistentemente negativas em doentes suspeitos de infeção por anaeróbios.

4.1. Perpetivas futuras

De momento, a deteção de bactérias anaeróbias por PCRtr não compete diretamente com a cultura. Para que esta técnica seja usada como método definitivo de diagnóstico, será necessário:

- A análise a maior número de amostras;
- Testar outros métodos de extração de DNA, principalmente para amostras purulentas;
- Deteção de outros géneros clinicamente importantes;
- Deteção de espécies ou grupos específicos como grupo *Bacteroides fragilis* e das espécies que o compõem devido há elevada variabilidade tanto na virulência como nos padrões de resistências aos antimicrobianos [21], [56].

Também a investigação da causa das disparidades, aquando da comparação da cultura com a PCRtr (por exemplo, por sequenciação), ajudaria a validar este método complementar no diagnóstico das infeções por anaeróbios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Citron, D.M.** 2011. Pre-molecular identification: ignorance was bliss? Anaerobe. **18**:189-191.

2. **Hentges, D.J**. 1996. Anaerobes: General Characteristics. *In* S. Baron (ed.), Medical Microbiology, 4th edition. University of Texas Medical Branch Galveston, TX.

3. **Hatheway, C.L**. 1990 Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev. **3**:66-98.

4. **Bartlett, J.G**. 2002. An update on mixed aerobic and anaerobic infections. Adv Stud Med. **2**:104-109.

5. **Bharadwaj, R**. 2012. Anaerobic microbiology: time to rejuvenate. Indian J Med Microbiol. **30**:3-5.

6. **Edmiston, C.E., C.J. Krepel, G.R. Seabrook, and W.G. Jochimsen**. 2002. Anaerobic infections in the surgical patient: microbial etiology and therapy. Clin Infect Dis. **35**:112-118.

7. **BD: GasPak™ EZ Gas Generating Container Systems**. https://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_gaspack_5_2540.pdf. Acesso a Novembro 2015

8. **Standard Unit, Department for Evaluations, Standards and Training**. Identification of Anaerobic Gram-negative rods. **1**:1-13.

9. **Finegold, S.M., H. Jousimies-Somer**. 1997. Recently described clinically important anaerobic bacteria: medical aspects. Clin Infect Dis. **25**:88-93.

10. **Jousimies-Somer, H**. 1997. Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. Clin Infect Dis. **25**:78-87.

11. **Summanen, P**. 1993. Recent taxonomic changes for anaerobic gram-positive and selected gram-negative organisms. Clin Infect Dis. **16**:168-174.

12. **Summanen, P**. 1995. Microbiology terminology update: clinically significant anaerobic gram-positive and gram-negative bacteria (excluding spirochetes). Clin Infect Dis. **21**:273-276.

13. **Jousimies-Somer, H**. 1995. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic gram-negative rods. Clin Infect Dis. **20**:187-191.

14. **Collins, M.D., P.A. Lawson, A. Willems, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J.A. Farrow**. 1994. The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol. **44**:812-826.

15. **Paster, B.J., F.E. Dewhirst, I. Olsen, and G.J. Frasen**. 1994. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. J. Bacteriol.**176**:725-732.

16. **Finegold, S.M., H.M. Hexler**. 1996. Present Status of Therapy for Anaerobic Infections. Clin Infect Dis. **23**:9-14.

17. **Murphy, E.C., I.M. Frick**. 2013. Gram-positive anaerobic cocci - commensals and opportunistic pathogens. FEMS Microbiol Rev. **37**:520-553.

18. **Standard Unit, Department for Evaluations, Standards and Training**. Identification of Anaerobic cocci. **2**:1-13.

19. **Jousimies-Somer, H., P. Summanen**. 2002. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). Clin Infect Dis. **35**:17-21.

20. **Hedberg, M., Nord, C.E.** (ed.). 2010-2014. Anaerobic Bacteria - Infectious Disease and Antimicrobial Agents. Antimicrobe. http://www.antimicrobe.org/b77.asp. Acesso Dezembro 23, 2015.

21. **Liu, C., Y. Song, M. McTeague, A.W. Vu, H. Wexler, and S.M. Finegold**. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. FEMS Microbiol. **222**:9-16.

22. **Tong J., C. Liu, P. Summanen, H. Xu, and S.M. Finegold**. 2001. Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. Anaerobe. **17**:64-68.

23. **Marchand-Austin A, P. Rawte, B. Toye, F.B. Jamieson, B.J. Farrell, and S.N. Patel**. 2014. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010–2011. Anaerobe. **28**:120-125.

24. **Wang, I.K., H.C. Lai, C.J. Yu, et al**. 2012. Real-Time PCR Analysis of the Intestinal Microbiotas in Peritoneal Dialysis Patients. Appl Environ Microbiol. **78**:1107-1112.

25. **Betriu, C., E. Culebras, M. Gómez, F. López, I. Rodríguez-Avial, and J.J. Picazo.** 2008. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother. **52**:2686-2690.

26. **M.J. Avila-Campos, C. Liu, Y. Song, M.C. Rowlinson, and S.M. Finegold**. 2007. Determination of bft gene subtypes in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. J Clin Microbiol. **45**:1336-1338.

27. **Wexler, H.M**. 2007. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clin Microbiol Rev. **20**:593-621.

28. **Bolstad, A.I., H.B. Jensen, and V. Bakken**. 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev. **9**:55-71.

29. **Vaisanen, M.L., M. Kiviranta, P. Summanen, S.M. Sidney, and H.R. Jousimies-Somer**. 1997. *Porphyromonas endodontalis*–Like Organisms from Extraoral Sources. Clin Infect Dis. **25**:191-193.

30. **Matto, J., S. Asikainen, M.L. Vaisanen, M. Rautio, M. Saarela, P. Summanen, S. Finegold, and H. Jousimies-Somer**. 1997. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in Extraoral and Some Odontogenic Infections. Clin Infect Dis. **25**:194-198.

31. **Ozbek, S.M., A. Ozbek**. 2010. Real-time polymerase chain reaction of "red complex" (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. **110**:670-674.

32. **Sherrard, L.J., S.J. Grath, L. McIlreavey, J. Hatch, M.C. Wolfgang, M.S. Muhlebach, D.F. Gilpin, J.S. Elborn, and M.M. Tunney**. 2015. Production of extended-spectrum β-lactamases and the potential indirect pathogenic role of

Prevotella isolates frim cystic fibrosis respiratory microbiota. Int J Antimicro Agen. **47**:140-145.

33. **Lee, D.G**. 2009. Clinical significance of anaerobic infections. Korean J Intern Med. **24**:11-12.

34. **Song,Y**. 2005. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. Anaerobe. **11**:79-91.

35. **Japanese Society of Chemotherapy Committee on guidelines for treatment of anaerobic infections, and Japanese Association for Anaerobic Infection Research.** 2011. Chapter 1-2. Anaerobic infections (general): testing anaerobic infections. J Infect Chemother. **17**:13-25.

36. **Wexler, H.M., S.M. Finegold**. 1998. Current susceptibility patterns of anaerobic bacteria. Yonsei Med J. **39**:495-501.

37. **Aldridge, K.E., D. Ashcraft, K. Cambre, C.L. Pierson, S.G. Jenkins, J.E. Rosenblatt**. 2001. Multicenter Survey of the Changing In Vitro Antimicrobial Susceptibilities of Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* Group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* Species. Antimicrob Agents Chemother. **45**:1238-1243.

38. **Finegold, S.M.** 1996. Anaerobic Gram-negativo bacilli. *In* S. Baron (ed.), Medical Microbiology, 4th edition. University of Texas Medical Branch Galveston, TX.

39. **Jousimies-Somer, H., P. Summanen, D.M. Citron, E.J. Baron, H.M. Wexler, and S.M. Finegold**. Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Sixth Edit. Star Publishing Company

40. **Snydman, D. R., N.V. Jacobus, L. McDermott, Y. Golan, D.W. Hecht, E.J.C. Goldstein, L. Harrel, S. Jenkins, D. Newton, C. Pierson, J.D. Rihs, V.L. Yu, R. Venezia, S.M. Finegold, J.E. Rosenblatt, and S.L. Gorbach**. 2010. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). Clin Infect Dis. **50**:26-33.

41. **Murdoch, D.A**. 1998. Gram-positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Rev.**11**:81-120.

42. **Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media**. 2009.

https://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf. Acesso Dezembro 2015.

43. **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5 % Sheep Blood.** 2011. http://www.bd.com/resource.aspx?idx=8985. Acesso Dezembro 2015.

44. **Anaerobic Bacteria Culture**. http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3406200024.html. Acesso Dezembro 2015.

45. **Atcc ®. Bacterial Culture Guide tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages**. http://www.atcc.org/~/media/PDFs/Culture%20Guides/Previews/ATCC_Bacterial_Culture_Guide_Preview.ashx. Acesso Janeiro 2016.

46. **Yang, L, B. Gu, G. Liu, W. Xia, K. Fan, Y. Mei, P. Huang, and S. Pan**. 2014. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. J Thorac Dis. **6**:517-523.

47. **Baron, E.J., J.M. Miller, M.P. Weinstein, S.S. Richten, P.H. Gilligan, R.B. Thomson Jr, P. Bourbeau, K.C. Carrol, S.C. Kehl, W.M. Dunne, B. Robsinson-Dunn, J.D. Schwartzman, K.C. Chapin, J.W. Synder, B.A. Forbes, R. Patel, J.E. Rosenblatt, and B.S. Pritt.** 2013. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. **57**:485-488.

48. **Lee, E.H.L., J.E. Degener, G.W. Welling, A.C.M. Veloo**. 2011. Evaluation of the Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. **49**:1745-1749.

49. **Yang, S., R.E. Rothman**. 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis. **4**:337-348.

50. **Standards Unit, Microbiology Services, Public Healh England**. 2015. UK Standards for Microbiology Investigations. Bacteriology. **3**: 1-29.

51. **Liu, C.Y., Y.T. Huang, C.H. Liao, L.C. Yen, H.Y. Lin, and P.R. Hsueh**. 2008. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. **52**:3161-3168.

52. **Life TechnologiesReal-time PCR handbook**. 2012:1-20. http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf. Acesso Setembro 2015.

53. **Han, A., J.M. Zenilman, J.H. Melendez, M.E. Shirtliff, A. Agostinho, G. James, P.S. Stewart, E.F. Mongodin, D. Rau, A.H. Rickard, and G.S. Lazarus**. 2011. The importance of a multi-faceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. Wound Repair Reag. **19**: 532-541.

54. **Boutaga, K., A.J. van Winkelhoff, C.M.J.E Vandenbroucke-Grauls, P.H.M. Savelkoul**. 2003. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. J Clin Microbiol. **41**:4950-4954.

55. **Rantakokko-Jalava, K., S. Nikkari, J. Jalava, E. Eeerola, M. Skurnik, O. Meurman, O. Ruuskanen, A. Alanen, E. Kotilainen, P. Toivanen, and P. Kotillainen**. 2000. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. J Clin Microbiol. **38**:32-39.

56. **Yamashita, Y., S. Kohno, H. Koga, K. Tomono, and M. Kaku**. 1994. Detection of *Bacteroides fragilis* in clinical specimens by PCR. J Clin Microbiol. **32**:679-683.

57. **Holst, H., N. Salling, K. Andresen, J.J. Christensen, and M. Kemp**. 2008. Detection of anaerobic prosthetic joint infection by PCR and DNA sequencing-a case report. Acta Orthop. **79**:568-570.

58. **Melendez, J.H., Y.M. Frankel, A.T. An AT, L. Williams, L.B. Price, N.Y. Wang, G.S. Lazarus, and M. Zenilman**. 2009. Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds. Clin Microbiol Infect. **16**:1762-1769.

59. **Boutaga, K., A.J. Van Winkelhoff, C.M.J.E.Vandenbroucke-Grauls, and P.H.M. Savelkoul**. 2005. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. FEMS Immunol Med Microbiol. **45**:191-199.

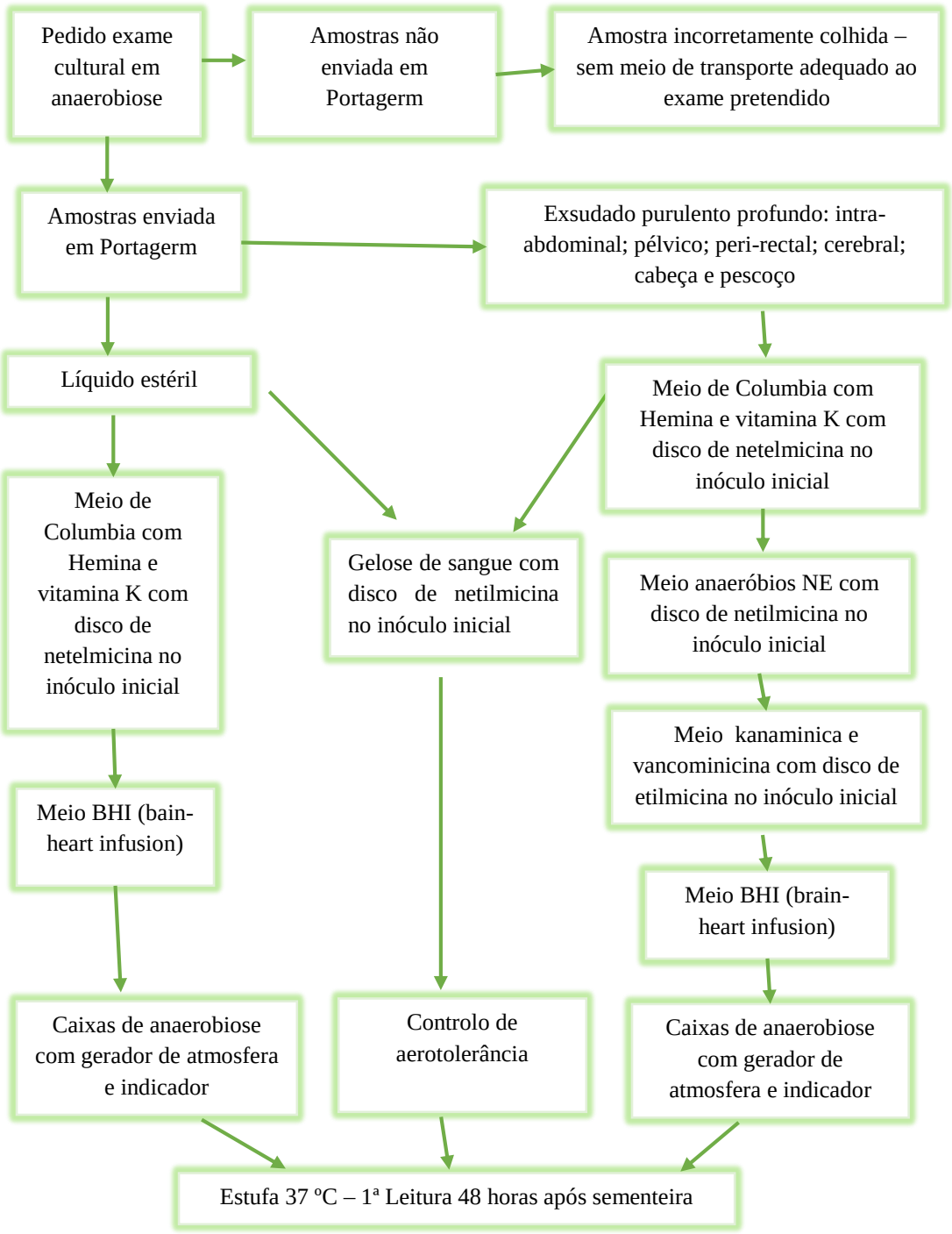
60. **Al-hebshi, N.N., H.M. Shuga-Aldin, A.K. Al-Sharabi, and I. Ghandur**. 2014. Subgingival periodontal pathogens associated with chronic periodontitis in Yemenis. BMC Oral Health. **14**:13.

61. **Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garret, R. Gentry, and G. Sayler.**

2006. Development of Bacteroides 16S rRNA gene Taqman-Based Real-Time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. Applied and Environmental Microbiol. **72**:4214-4224.

7. ANEXOS

Anexo I - Fluxograma processamento de anaeróbios HEM (Resp. Dra. Elsa Gonçalves).



Anexo II – Resultados BLAST

PrevsppF – ACCAgCCAAgTAgCgTgCA (10 primeiros resultados)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accessior
Prevotella denticola F0289 strain F0289 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_102922.1
Prevotella intermedia 17 strain 17 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_102907.1
Prevotella melaninogenica strain ATCC 25845 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_102895.1
Prevotella ruminicola strain Bryant 23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_102887.1
Prevotella dentalis strain DSM 3688 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_102481.1
Prevotella jejuni strain CD3_28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_109628.1
Alloprevotella rava strain 81/4-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_118334.1
Prevotella scopos strain JCM 17725 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_114305.1
Prevotella fusca strain JCM 17724 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_114304.1
Prevotella copri strain JCM 13464 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_113411.1

PrevsppR – TggACCTTCCGTATTACCgC (10 primeiros resultados)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Prevotella intermedia 17 strain 17 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_102907.1
Prevotella melaninogenica strain ATCC 25845 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_102895.1
Prevotella ruminicola strain Bryant 23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_102887.1
Alloprevotella rava strain 81/4-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_118334.1
Prevotella scopos strain JCM 17725 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_114305.1
Prevotella saccharolytica strain JCM 17484 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113320.1
Xylanibacter oryzae strain JCM 13648 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113227.1
Prevotella paludivivens strain JCM 13650 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113122.1
Prevotella pallens strain JCM 11140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113121.1
Prevotella nanceiensis strain JCM 15639 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113114.1

Sonda *Prevotella* – AATAAggACCggCTAATTCCRgTgCCAg (10 primeiros resultados)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Prevotella denticola F0289 strain F0289 16S ribosomal RNA, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_102922.1
Prevotella intermedia 17 strain 17 16S ribosomal RNA, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_102907.1
Prevotella melaninogenica strain ATCC 25845 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_102895.1
Prevotella ruminicola strain Bryant 23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_102887.1
Prevotella dentalis strain DSM 3688 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_102481.1
Prevotella jejuni strain CD3_28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_109628.1
Prevotella scopos strain JCM 17725 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_114305.1
Prevotella fusca strain JCM 17724 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_114304.1
Prevotella copri strain JCM 13464 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_113411.1
Prevotella saccharolytica strain JCM 17484 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_113320.1

BactsppF – gggTTTAAAgggAgCgTAgg (10 primeiros resultados)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pedobacter rivuli strain HME8457 16S ribosomal RNA, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_134128.1
Pedobacter pituitosus strain MIC2002 16S ribosomal RNA, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_134127.1
Pseudopedobacter beijingensis strain GCS-AE-31 16S ribosomal RNA, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_133830.1
Pedobacter hainanensis strain 13-Q 16S ribosomal RNA, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_132722.1
Prevotella denticola F0289 strain F0289 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_102922.1
Prevotella melaninogenica strain ATCC 25845 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_102895.1
Prevotella dentalis strain DSM 3688 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_102481.1
Niabella drilacis strain E90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_109744.1
Niabella hirudinis strain E96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_109743.1
Bacteroides fragilis YCH46 strain YCH46 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_074839.1

BactsppR – CTACACCACgAATTCCgCCT (10 primeiros resultados)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacteroides luti strain UasXn-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_125463.1
Bacteroides salanitronis strain DSM 18170 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_074616.1
Bacteroides helcogenes strain P 36-108 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_074546.1
Bacteroides vulgatus strain ATCC 8482 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_074515.1
Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_074234.1
Porphyromonas gingivalis W83 strain W83 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_074230.1
Fulvitalea axinellae strain VI.18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_109512.1
Bacteroides stercorirosoris strain JCM 17103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113207.1
Bacteroides zoogleoformans strain JCM 16136 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113353.1
Prevotella saccharolytica strain JCM 17484 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.049	100%	NR_113320.1

Sonda *Bacteroides* (10 primeiros resultados)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacteroides luti strain UasXn-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_125463.1
Bacteroides fragilis YCH46 strain YCH46 16S ribosomal RNA, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074839.1
Bacteroides fragilis strain NCTC 9343 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074784.1
Bacteroides helcogenes strain P 36-108 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074546.1
Bacteroides vulgatus strain ATCC 8482 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074515.1
Bacteroides thetaiotaomicron strain VPI-5482 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074277.1
Bacteroides reticulotermitis strain JCM 10512 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_114316.1
Bacteroides stercorirosoris strain JCM 17103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_113207.1
Bacteroides faecichinchillae strain JCM 17102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_113206.1
Bacteroides rodentium strain JCM 16496 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_113072.1

BfragF – TCRggAAgAAAgCTTgCT (resultados com o mesmo E-value)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacteroides fragilis YCH46 strain YCH46 16S ribosomal RNA, complete sequence	33.4	33.4	100%	5.2	94%	NR_074839.1
Bacteroides fragilis strain NCTC 9343 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	33.4	33.4	100%	5.2	94%	NR_074784.1
Bacteroides fragilis strain JCM 11019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.4	33.4	100%	5.2	94%	NR_112936.1
Bacteroides fragilis strain DSM 2151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.4	33.4	100%	5.2	94%	NR_112141.1
Bacteroides fragilis strain ATCC 25285 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	33.4	33.4	100%	5.2	94%	NR_119164.1

BfragR – CATCCTTTACCggAATCCT (resultados com o mesmo E-value)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacteroides fragilis YCH46 strain YCH46 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_074839.1
Bacteroides fragilis strain NCTC 9343 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_074784.1
Bacteroides fragilis strain JCM 11019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_112936.1
Bacteroides fragilis strain DSM 2151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_112141.1
Bacteroides fragilis strain ATCC 25285 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.19	100%	NR_119164.1

Sonda *Bacteroides fragilis* (resultados com o mesmo E-value)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacteroides fragilis YCH46 strain YCH46 16S ribosomal RNA, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074839.1
Bacteroides fragilis strain NCTC 9343 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_074784.1
Bacteroides salyersiae strain JCM 12988 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_112942.1
Bacteroides fragilis strain JCM 11019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_112936.1
Bacteroides salyersiae strain WAL 10018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_043016.1
Bacteroides fragilis strain DSM 2151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_112141.1
Bacteroides fragilis strain ATCC 25285 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	54.0	54.0	100%	1e-05	100%	NR_119164.1

Anexo III – Resultados obtidos por cultura e PCRtr.

Identificação	Local	Exame cultural anaerobiose	Bactspp	Prevspp	Antibioterapia
ME113489	Exsudado local cirúrgico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Ampicilina e Ciprofloxacina
ME113602	Exsudado local cirúrgico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	38,83	0	Meropenem
ME113758	Abcesso cervical	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Clindamicina; piperacilina tazobactam
ME113789	Fasceíte necrozante	*Finegoldia magna/Prevotella disiense*	0	33,08	Clindamicina; Meropenem
ME113805	Exsudado profundo	*Prevotella oris; Prevotella intermedia*	0	32,9	Ceftriaxone: Clindamicina
ME113835	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
ME114023	Exsudado local cirúrgico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefoxitina: Metronidazol
ME114026	Exsudado local cirúrgico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefoxitina: Metronidazol
ME114027	Exsudado local cirúrgico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefoxitina: Metronidazol
ME114389	Intra abdominal;	*Bacteroides fragilis; Parvimonas micra; Prevotella intermedia; Clostridium sporogenes*	34,925	39,485	Gentamicina; Metronidazol
ME114473	Laparotomia mediana	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Amoxicilina+Ac clavulânico
ME114490	Laparotomia mediana - umbigo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Ciprofloxacina
ME114491	Laparotomia mediana - loca caudal	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Ciprofloxacina
ME116860	Exsudado profundo	*Prevotella oralis; Prevotella intermedia Parvimonas micra*	0	33,225	Sem informação
ME116908	Bílis	Negativo para	0	0	Piperacilina/tazobactam;

		anaeróbios obrigatórios			metronidazol
ME116940	Exsudado local cirúrgico	*Bacteroides vulgatus*	27,87	0	Meropenem
ME116941	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Amoxicilina+Ac clavulânico
ME117846	Exsudado local cirúrgico-Abdómen	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
ME117993	Nódulo prostático	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Trimetoprim-sulfametoxazol
ME118115	Exsudado profundo	*Prevotella oralis; Prevotella buccae; Prevotella intermédia*	0	21,84	Sem informação
ME118163	Ferida cirúrgica	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
ME118282	Ferida cirúrgica	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	39,34	Sem informação
ME118670	Líquido peritoneal	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
ME118769	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
ME118970	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
ME119094	Local cirúrgico	*Bacteroides vulgatus*	0	0	Sem informação
ME119168	Líquido peritoneal	*Peptoniphilus asaccharolyticus*	0	0	Meropenem
ME120152	Exsudado ferida operatória	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação

Identificação	Local	Exame cultural anaerobiose	Bactspp	Prevspp	Antibioterapia
MS87806	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem; vancomicina
MS87914	Tecido desvitalizado perianal	*Prevotella melaninogenica*	0	26,54	Gentamicina; vancomicina; metronidazol
MS87970	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS88338	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS88485	Liquído pericárdico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS88614	Dreno mediastino	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS88615	Dreno mediastino	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS88616	Dreno mediastino	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS88617	Dreno mediastino	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS88618	Dreno mediastino	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS88744	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS88938	Exsudado profundo	*Bacteroides fragilis; Clostridium sporogenese*	22,565	26,425	Piperacilina/tazobactam; Metronidazol
MS89280	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Flucloxacilina
MS89424	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefazolina
MS89678	Liquído articular	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Vancomicina
MS89679	Liquído articular	Negativo para anaeróbios	0	0	Vancomicina

		obrigatórios			
MS89817	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS89894	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefazolina
MS89938	Liquído articular	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Piperacilina/tazobactam
MS90389	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MS90668	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefoxitina
MS90753	Exsudado profundo	*Bacteroides fragilis*; BGN não identificado pigmentado	22,985	27,445	Ciprofloxacina
MS90830	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS90990	Ferida operatória	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem; metronidazol
MS91355	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS91420	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS91499	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Gentamicina; vancomicina
MS91500	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Gentamicina; vancomicina
MS91557	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS92312	Liquído Ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MS92411	Abdominal	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Trimetoprim/sulfametoxazol

Identificação	Local	Exame cultural anaerobiose	Bactspp	Prevspp	Antibioterapia
MX147080	Líquido peritoneal	*Bacteroides ovatus/Prevotella spp*	20,6	38,81	Piperacilina/tazobactam
MX147254	Parede abdominal	*Prevotella oralis*	0	0	Sem informação
MX147333	Exsudado profundo	BGN pigmentado não identificado	35,11	0	Sem informação
MX147613	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX147726	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem; piperacilina/tazobactam
MX148014	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Amoxicilina+ac clavulânico
MX148275	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX148292	Liquído sinovial	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Gentamicina, vancomicina
MX148352	Pús (Intra abdominal)	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX148787	Liquído articular (joelho esquerdo)	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Flucloxacilina; Rifampicina
MX148853	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX148982	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MX149221	Necrose dedo pé	*Anaerococcus prevotii; BGN pigmentado não identificado*	0	0	Piperacilina/tazobactam
MX149485	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	38,54	0	Sem informação
MX149689	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX149766	Exsudado profundo - Intra-	*Bacteroides fragilis/Clostridium spp./Porphyromona*	25,49	0	Sem informação

	abdominal	*s gingivalis*			
MX150576	Loca peri sinfise púbica; osteomielite crónica	*Bacteroides fragilis; Prevotella disiens; Anaerococcus prevotii*	26,39	0	Piperacilina/tazobactam
MX152516	Liquído sinovial	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX152531	Liquído ascítico	*Prevotella disiens; Prevotella oralis; Bifidobacterium*	29,44	24,48	Sem informação
MX152800	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Clindamicina
MX152976	Abcesso intra abdominal	*Prevotella melaninogenica*	0	0	Meropenem
MX153258	Exsudado profundo	*Bacteroides thetaiotaomicron*	33,77	0	Gentamicina; metronidazol
MX153524	Exsudado profundo	*Bacteroides fragilis*	37,83	0	Piperacilina/tazobactam
MX153608	Exsudado profundo	*Peptococcus anaerobius; Finegoldia magna Porphyromonas spp*	0	29,455	Clindamicina; Meropenem
MX153905	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MX154125	Ferida pre tibial	Negativo para anaeróbios obrigatórios	39,94	0	Sem informação
MX154127	Exsudado profundo	*Peptococcus anaerobius; Prevotella intermedia*	20,495	0	Ampicilina; gentamicina; metronidazol
MX154386	Liquído sinovial	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Cefuroxima
MX154508	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Clindamicina; gentamicina
MX154595	Exsudado profundo	*Bacteroides fragilis*	0	0	Clindamicina; gentamicina
MX154730	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX155198	Exsudado purulento	Negativo para anaeróbios	0	0	Ceftriaxone; vancomicina;

	cerebral	obrigatórios			metronidazol
MX155437	Liquído sinovial	Negativo para anaeróbios obrigatórios	44,18	0	Sem informação
MX155443	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Piperacilina/tazobactam
MX155510	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Piperacilina/tazobactam
MX155671	Exsudado profundo	Negativo para anaeróbios obrigatórios	31,605	0	Piperacilina/tazobactam ; metronidazol
MX155950	Exsudado profundo	*Prevotella denticola; Prevotella melaninogenica*	0	27,655	Ciprofloxacina
MX156130	Exsudado profundo	*Bacteroides stercoris*	0	0	Ampicilina; gentamicina; clindamicina
MX156234	Exsudado profundo - Intra-abdominal	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Piperacilina/tazobactam
MX156324	Exsudado profundo - Abcesso intramuscular	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Meropenem
MX156339	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Sem informação
MX156490	Exsudado profundo - Intra-abdominal	*Bacteroides thetaiotaomicron*	24,595	28,515	Piperacilina/tazobactan
MX156811	Bílis	Negativo para anaeróbios obrigatórios	0	0	Piperacilina/tazobactam
MX157028	Liquído ascítico	Negativo para anaeróbios obrigatórios	37,73	0	Piperacilina/tazobactam