

Nelson Astur Neto

**INFECÇÃO SUBCLÍNICA DO DISCO INTERVERTEBRAL EM
CIRURGIAS DE HÉRNIA DE DISCO LOMBAR: coorte prospectiva**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2023

Nelson Astur Neto

**INFECÇÃO SUBCLÍNICA DO DISCO INTERVERTEBRAL EM
CIRURGIAS DE HÉRNIA DE DISCO LOMBAR: coorte prospectiva**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mario Lenza

Coorientador: Prof. Dr. Delio Eulálio Martins
Filho

São Paulo

2023

Astur Neto, Nelson

Infecção subclínica do disco intervertebral em cirurgias de hérnia de disco lombar : coorte prospectiva / Nelson Astur Neto. -- São Paulo, 2023.
xv, 75 f.

Tese (Doutorado) - Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Subclinical infection of the intervertebral disc in lumbar disc herniation surgery: prospective cohort.*

1. *Propionibacterium acnes*. 2. Deslocamento do disco intervertebral.
3. Degeração do disco intervertebral. 4. Infecção.

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Nelson Astur Neto

**INFECÇÃO SUBCLÍNICA DO DISCO INTERVERTEBRAL EM
CIRURGIAS DE HÉRNIA DE DISCO LOMBAR: coorte prospectiva**

Presidente da banca: Prof. Dr. Mario Lenza

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Moises Cohen

Profa. Dra. Patrícia Maria de Moraes Barros Fucs

Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino

Membros suplentes:

Profa. Dra. Maria Fernanda Silber Caffaro

Dr. Roberto Dantas Queiroz

Dr. Pedro Debieux Vargas Silva

Aprovada em: 10/07/2023.

Dedicatória

Aos meus filhos, Matheus e Nicholas, amores da minha vida, que trazem luz e alegria ao nascer de cada dia. A maior razão para nunca parar.

À minha esposa, Denise. Meu eterno porto seguro. Fiel companhia da minha vida. Que me apoia nos meus projetos, e me guia sempre que preciso. Companheira também na vida cirúrgica profissional. Sem seu apoio nada seria possível. Serei sempre grato por estar ao meu lado.

Aos meus pais, Nelson e Elisa. Exemplos de caráter e bondade, dedicação e persistência. Ensinaaram-me que fazer o bem aos outros sem esperar nada de volta é essencial para estar bem consigo próprio. Sempre acreditaram e incentivaram. Me guiaram com o maior exemplo de como construir uma família baseada em amor, respeito e união.

Ao meu irmão Diego, companheiro na profissão e na vida. Trilhamos juntos os desafios da faculdade de medicina, residência médica e profissão. Amigo sincero, parceiro e presente em todos os momentos da minha vida. Junto com sua esposa, Máira, formou uma família linda, trazendo minhas amadas sobrinhas Laís e Sofia.

Ao meu irmão Flavio, que traz equilíbrio para a família, orientando e mostrando uma segunda opção de caminho e orientação nos meus empreendimentos fora da profissão médica. Construiu uma linda família com sua esposa, Nathália, e meus sobrinhos queridos, Caio e Eduarda.

Aos meus sogros, Milton e Rosa. Me acompanham desde a faculdade de medicina em cada passo da minha carreira profissional. Exemplos de amor às suas filhas e aos seus netos. Sempre disponíveis para cuidar dos meus filhos quando preciso do tempo para dedicar à profissão.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Miguel Cendoroglo, diretor médico e superintendente do Hospital Israelita Albert Einstein, por apoiar e incentivar os trabalhos que são conduzidos na instituição.

Ao Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo, coordenador do curso de Pós-Graduação *strictu sensu* em Ciências da Saúde da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, que mantém o alto nível do programa de Pós-Graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Lenza, doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), profissional que ajudou a engrandecer a Ortopedia e Traumatologia do Hospital Israelita Albert Einstein, apoiando projetos científicos, ensinando e estimulando cada um dos seus alunos a contribuir para o crescimento do grupo.

Ao meu coorientador, Dr. Delio Eulalio Martins Filho, doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), profissional admirável, que trabalhou comigo neste e em tantos outros projetos, sempre disposto a ajudar e trazer soluções nos percalços eventuais. Grande amigo que abriu as portas do consultório e do centro cirúrgico para trabalharmos juntos na profissão e nos projetos pessoais também.

Ao Dr. Marcelo Wajchenberg, doutor em Ciências Médicas e Biológicas pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), coordenador do grupo de coluna do Instituto Cohen e que abriu as portas para minha entrada no Hospital Israelita Albert Einstein. Pelo apoio incontestável durante todo o projeto e pós-graduação e por convidar seus pacientes para participar da pesquisa.

Aos colegas do laboratório de microbiologia do Hospital Israelita Albert Einstein, Dr. André Mario Doi, doutor em Medicina Translacional pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e Dra. Marinês Dalla Valle Martino, doutora em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Por toda a disponibilidade e energia no desenvolvimento deste projeto, não medindo esforços para que tivesse a melhor metodologia possível.

Aos colegas do Departamento de Radiologia do Hospital Israelita Albert Einstein, Dr. Laercio Alberto Rosemberg, doutor em Radiologia pela Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo, Dr. Durval do Carmo Barros Santos e Dr. Eduardo Noda Kihara Filho. Agradeço o apoio na confecção do projeto e na ajuda em coletar dados dos exames de imagem deste estudo.

Aos médicos do *board* de coluna do Hospital Israelita Albert Einstein. Por toda a ajuda na captação de pacientes para este projeto e por confiar em mim para conduzir um projeto de pesquisa com envolvimento deles. Em especial ao Dr. Alberto Ofenhejm Gotfryd, doutor em Ciências da Saúde pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, e Dr. Luciano Miller Reis Rodrigues, doutor em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina do ABC.

Às enfermeiras do *board* de coluna do Hospital Israelita Albert Einstein. Por todo apoio e ajuda na captação de informações dos pacientes. Pelo profissionalismo e confidencialidade ao abordar os pacientes nesse projeto.

Ao amigo de trabalho Dr. Michel Kanas, companheiro de muitas cirurgias e projetos de consultório. Pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos do dia a dia.

À nossa fiel instrumentadora Bruna Derico. Pela ajuda na coleta de dados e contato com os pacientes durante o seguimento deles no período do estudo.

À Dra. Camila Cohen Kaleka, doutora em Ciências da Saúde pelo Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Pelo incentivo e ajuda durante toda a pós-graduação e pelo companheirismo e apoio constante na vida pessoal e profissional.

À Sra. Elivane da Silva Victor, coordenadora estatística do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, pela ajuda na execução deste trabalho e dedicação aos alunos no ensinamento em estatística.

A todos da Diretoria de Pesquisa do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IIEP) do Hospital Israelita Albert Einstein.

Aos membros do Grupo do Departamento do Aparelho Locomotor pelo estímulo em finalizar este trabalho.

A todos os amigos que fiz durante a Pós-Graduação no Hospital Israelita Albert Einstein.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fomento a este projeto em particular e pelo apoio à pesquisa acadêmica no estado de São Paulo (processo: 2016/15830-7).

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a beleza libertadora do intelecto para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Anatomia, fisiologia e histologia vertebral aplicada à degeneração discal	1
1.2 Dor lombar crônica e degeneração discal	3
1.3 <i>Cutibacterium acnes</i> e inflamação.....	5
1.4 Evidência da bactéria no disco intervertebral proposta como causa da dor	7
1.5 Estudos que relacionam <i>C. acnes</i> com a degeneração discal e alterações do tipo Modic tipo I	8
1.6 Estudos refutando a hipótese da participação do <i>C. acnes</i> na degeneração do disco e alterações Modic	9
1.7 Eficácia de antibióticos orais para dor lombar crônica.....	11
1.8 Objetivos.....	12
2 MÉTODOS	14
2.1 Considerações éticas, de financiamento e publicação	14
2.2 Desenho do estudo e local	14
2.3 Participantes: recrutamento e inclusão no estudo	15
2.4 Tratamento recebido por todos os pacientes.....	16
2.5 Avaliações	18
2.5.1 Questionários	18
2.5.2 Exame de imagem.....	18
2.5.3 Coleta de material tecidual para análise histológica e microbiológica	20
2.5.4 Análise histológica	22
2.5.5 Pesquisa de microrganismos: culturas	22
2.5.6 Identificação molecular dos patógenos: sequenciamento de nova geração	23
2.6 Mascaramento	26
2.7 Definição dos desfechos.....	27
2.7.1 Desfechos primários	27
2.7.2 Desfechos secundários	28
2.7.3 Variáveis de confusão	29

2.8 Cálculo do tamanho da amostra.....	30
2.9 Análise estatística.....	30
3 RESULTADOS	32
3.1 Descrição dos pacientes.....	32
3.2 Microrganismos identificados	36
3.3 Avaliação das alterações de Modic nas imagens de ressonância magnética	37
3.4 Medidas avaliadas ao longo do tempo	38
3.5 Microbioma do disco degenerado (sequenciamento de nova geração)	40
4 DISCUSSÃO	47
4.1 Baixa prevalência de infecção do disco herniado.....	47
4.2 Cuidados metodológicos em investigação aprofundada	50
4.3 Alterações tipo Modic: o estudo de coorte.....	55
4.4 Limitações e pontos positivos.....	56
5 CONCLUSÕES	58
6 APRESENTAÇÃO DO ARTIGO	59
7 MÉTRICAS	60
7.1 Métricas do periódico	60
7.1.1 Fator de impacto.....	60
7.2 Métricas do artigo	61
7.2.1 Citações.....	61
7.2.2 Altimetria	61
7.3 Métricas do autor	62
7.3.1 Redes científicas	62
7.3.2 Trabalhos publicados.....	62
7.3.3 Mediana do fator de impacto dos trabalhos publicados.....	65
7.3.4 Citações recebidas	66
7.3.5 H-index e m-quociente.....	66
8 REFERÊNCIAS	70
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Anatomia da unidade motora da coluna vertebral lombar	1
Figura 2. Método de mensuração radiologia do tamanho da alteração de Modic de acordo com altura e largura no corte sagital em imagem do banco de dados deste estudo	19
Figura 3. Localização dos pontos de retirada de amostras teciduais durante a cirurgia para tratamento de hérnia do disco intervertebral	21
Figura 4. Uso das amostras teciduais coletadas de cada tecido	21
Figura 5. Remanescentes bacterianos mais frequentes e o número de amostras de disco com pelo menos uma sequência desse patógeno.....	45
Figura 6. Classificação taxonômica dos patógenos encontrados na análise de microbioma da amostra do paciente com maior diversidade de bactérias encontrado (número 16).....	46

Lista de tabelas

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta e positividade para cultura tecidual do disco intervertebral	33
Tabela 2. Características clínicas dos pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta.....	34
Tabela 3. Características cirúrgicas dos pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta.....	35
Tabela 4. Resultados da pesquisa de microrganismos em pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta....	36
Tabela 5. Comparações relativas a área de alteração de Modic em milímetros quadrados (mm ²) entre pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta.....	38
Tabela 6. Características observadas ao longo do tempo	39
Tabela 7. Distribuição das amostras sequenciadas e da porcentagem do total das sequências mapeadas, número de bactérias mapeadas, gênero identificado e número de sequências para cada bactéria.....	41

Lista de abreviaturas

DLC	Dor lombar crônica
DP	Desvio padrão
EQ-5D	EuroQol-5D
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
IMC	Índice de massa corpórea
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NRS	Escala numérica de dor (<i>Numerical rating scale</i>)
ODI	Índice de Incapacidade de Oswestry (<i>Oswestry disability index</i>)
PCR	Reação de polimerase em cadeia (<i>Polymerase chain reaction</i>)
STROBE	<i>Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology</i>
VAS	Escala visual analógica
VHS	Velocidade de hemossedimentação

Resumo

Introdução: *Cutibacterium acnes* é uma bactéria presente naturalmente na pele e outras partes do corpo humano. O papel do *C. acnes* (antigamente conhecido como *Propionibacterium acnes*) na patofisiologia da acne está bem estabelecido, mas há relatos do achado desse organismo como patógeno responsável por condições inflamatórias e infecção pós-operatória com ou sem implantes. *C. acnes* foi descrito como causador de alterações do tipo I de Modic à ressonância magnética da coluna, e esta bactéria foi isolada em culturas de amostras de disco intervertebral. **Objetivos:** Investigar a frequência de infecção bacteriana, especificamente, de *C. acnes*, nas amostras discais de pacientes com hérnia de disco intervertebral lombar; avaliar fatores prognósticos dos pacientes com positividade para *C. acnes* nas amostras discais e a relação de alterações radiológicas (Modic tipo I e II) com a infecção um ano após a cirurgia de hérnia de disco. **Métodos:** Foi realizado um estudo de coorte prospectivo em centro único no Hospital Israelita Albert Einstein, em que pacientes consecutivamente operados de hérnia discal tiveram amostra do disco, do músculo multifídeo (controle) e do ligamento amarelo (controle) extraídos para cultura. Os pacientes foram avaliados quanto à função e dor antes da cirurgia e um ano depois, quando também por ressonância magnética. Uma subamostra de 17 pacientes foi submetida a análise molecular do tipo *next generation sequencing*. Foi realizada análise descritiva e comparação de grupos de pacientes com e sem positividade usando-se os testes *t* de Student, de Mann-Whitney, de qui-quadrado ou exato de Fisher conforme apropriado, e comparações pré e pós-cirurgia quanto a Modic com o teste de Wilcoxon. **Resultados:** No período de maio de 2017 a setembro de 2019, 112 pacientes com hérnia de disco lombar foram submetidos a microdiscectomia aberta e incluídos no estudo, 67 (59,8%) homens. O resultado das culturas dos tecidos mostrou uma minoria (14 casos, 12,5%) com positividade para qualquer crescimento bacteriano, três (2,7%) com cultura positiva no ligamento, sete (6,3%) no disco e 12 (10,7%) no músculo. Dois pacientes tiveram *C. acnes* cultivado de amostra no disco. A baixa positividade impediu a investigação das relações entre fatores de prognóstico clínico e infecção. Não foram encontradas evidências de alterações Modic entre os pacientes com e sem crescimento bacteriano em cultura, independentemente do período, pré ou pós-operatório. Não houve diferenças clínicas, de dor ou funcionais entre pacientes com e sem infecção ou contaminação

intraoperatória do disco. Os últimos 17 pacientes submetidos ao *next generation sequencing* apresentaram cultura do disco com resultado negativo para *C. acnes*, assim como cultura negativa do músculo e do ligamento amarelo. Dessa maneira, nenhum desses pacientes foi considerado como infecção ou contaminação intraoperatória.

Conclusões: Apenas dois pacientes (1,8%) apresentaram culturas positivas somente no disco, configurando infecção. *C. acnes* não foi identificado em nenhuma análise de microbioma de disco. Não foi observada associação significativa entre positividade para infecção dos tecidos e qualquer fator de prognóstico clínico.

Identificador ClinicalTrials.gov: NCT03158766

Descritores: *Propionibacterium acnes*; *Cutibacterium acnes*; Deslocamento do disco intervertebral; Degeneração do disco intervertebral; Infecção

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia, fisiologia e histologia vertebral aplicada à degeneração discal

A unidade motora da coluna vertebral lombar compreende um disco intervertebral e suas duas vértebras adjacentes, sendo uma cranial e outra caudal a este disco, as articulações facetárias posteriores entre essas duas vértebras e suas cápsulas, os ligamentos envolvidos na estabilização (ligamento longitudinal anterior, posterior, ligamento amarelo e complexo ligamentar posterior), assim como a musculatura paravertebral. Os discos entre cada corpo vertebral são estruturas fibrocartilaginosas que fornecem suporte, flexibilidade e distribuição de carga. São primariamente compostos por duas zonas, o núcleo pulposo no seu centro, e o ânulo fibroso em toda periferia. Esse conteúdo discal tem sua interface com o corpo vertebral cranial e caudal na região conhecida como placas terminais (Figura 1).⁽¹⁾

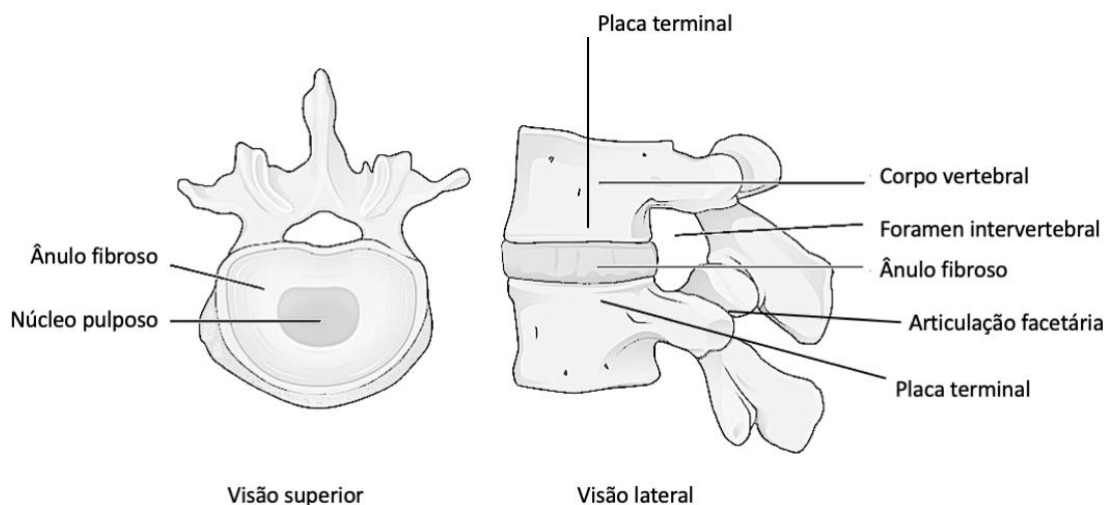


Figura 1. Anatomia da unidade motora da coluna vertebral lombar

O ânulo fibroso é uma camada circular periférica abundante em colágeno tipo I e resistente às forças de tensão excêntricas devido à disposição oblíqua alternada e laminar das fibras de colágeno. O núcleo pulposo é composto por proteoglicanos e água conectadas por rede de colágeno tipo II e fibras de elastina. O proteoglicano mais abundante no núcleo pulposo é o agrecan, que provê as propriedades osmóticas necessárias para a resistência a compressão. O disco intervertebral é uma

das maiores estruturas avasculares do corpo. A nutrição do disco se dá por meio de difusão de nutrientes na placa terminal proveniente de vasos do osso subcondral adjacente à cartilagem hialina. Moléculas pequenas, como a glicose e oxigênio, passam pela placa terminal por meio de difusão passiva. As células do disco mantêm o metabolismo discal pelo controle de diversos componentes como citocinas, enzimas e fatores de crescimento.⁽¹⁾

Os condrócitos produzem proteoglicanos e colágeno, que é a estrutura básica de suporte do disco. O agregan é o proteoglicano mais comum do disco e compõe cerca de 70% do núcleo pulposo e 25% do ânulo fibroso. O disco normal retém água em uma matriz gerando alta viscoelasticidade. O agregan tem alta pressão osmótica oriunda da água acumulada no núcleo pulposo e tende a inflar a rede de colágenos local.⁽²⁾ A alta concentração de agregan no disco íntegro confere ao tecido a capacidade de suportar cargas compressivas sem colapsar e a carga é distribuída uniformemente no ânulo fibroso e corpo vertebral durante os movimentos de flexão e extensão da coluna lombar.⁽³⁾

Se o ânulo fibroso é lesionado, o conteúdo do núcleo pulposo pode escapar pela ruptura anular. O processo de cicatrização de um ânulo lesionado é seguido por alterações degenerativas. O disco intervertebral lesionado tem maior concentração de citocinas catabólicas, atividade de metaloproteína e formação de tecido cicatricial. O transporte pobre de nutrientes pelo disco é considerado uma das causas do processo degenerativo do disco intervertebral. A concentração de células no ânulo fibroso diminui com o passar da idade. As células do disco estão sujeitas a senescência e perder a habilidade de se proliferar. A diminuição anabólica e aumento do catabolismo das células senescentes pode levar ao processo degenerativo. Apesar de todos os discos da coluna vertebral de um mesmo indivíduo terem a mesma idade, os discos dos segmentos lombares caudais estão mais vulneráveis aos processos degenerativos do que os segmentos lombares mais craniais. Isso sugere que a carga mecânica em cada segmento motor da coluna lombar é um fator causal maior que o envelhecimento.⁽⁴⁾

A diminuição do número de células discais, assim como sua atividade, depende de fatores como carga mecânica, transporte de nutrientes, estilo de vida, fatores genéticos e fatores de crescimento. Estes fatores alteram o metabolismo do agregan e do colágeno. A distribuição e tipos de colágeno no núcleo muda. Com o envelhecimento, a viscosidade e propriedades hidrofílicas do núcleo pulposo diminuem à medida que o agregan é fragmentado e seu peso molecular e quantidade caem.⁽²⁾ Se o conteúdo

líquido da matriz extracelular diminui, haverá uma diminuição na altura do disco intervertebral assim como na sua resistência à carga axial. Rupturas do ânulo fibroso podem ocorrer mais facilmente à medida que a carga axial no núcleo deficitário é transferida diretamente ao ânulo.⁽³⁾ Dessa maneira, o disco degenerado começa a desenvolver abaulamentos e protusões ao seu redor. Essas mudanças do disco degenerado têm grande influência na unidade motora vertebral, sobrecarregando as placas terminais e osso subcondral, e podem afetar a função dos ligamentos e facetas articulares, levando ao processo degenerativo de todo segmento, conhecido com espondilodiscoartrose.

Ao mesmo tempo, a falha no suprimento nutricional do disco é outro fator causal de degeneração discal. Com a idade, a deficiência nutricional das células discais é acelerada pelo tabagismo, calcificação da placa terminal e estado nutricional geral. O déficit nutricional e baixa pressão de oxigênio no disco leva ao acúmulo de ácido láctico. Essas mudanças afetam a capacidade do disco de sintetizar e manter sua matriz extracelular e levar a degeneração.

Diferentemente das outras estruturas musculoesqueléticas, o disco intervertebral apresenta alterações degenerativas já no fim da segunda década de vida e início da terceira. Entretanto, nem sempre o disco degenerado leva a sintomas. A incidência de degeneração de pelo menos um disco intervertebral lombar em pessoas entre 20 e 40 anos é de cerca de 35%, enquanto quase todos com 60 a 80 anos de idade apresentarão degeneração discal.⁽⁵⁾ Não é simples diferenciar o processo natural de envelhecimento da degeneração patológica em pacientes que apresentam sintomas. Mudanças degenerativas precoces do disco podem ser definidas como alterações metabólicas e bioquímicas da idade sem nenhuma falha estrutural. Por outro lado, a doença degenerativa do disco intervertebral deve estar ligada a dor lombar, com falhas estruturais, incluindo lesões radiais do ânulo fibroso, hérnia de disco e calcificação ou danos nas placas terminais vertebrais.

1.2 Dor lombar crônica e degeneração discal

Dor lombar crônica (DLC) inespecífica é uma das maiores causas de incapacidade e afastamento laboral, afetando cerca de um bilhão de pessoas no mundo.^(6,7) A natureza multifatorial da DLC inespecífica, incluindo fatores físicos,

funcionais, psicológicos, profissionais e sociais, é reconhecida e aceita. Estratégias que foram desenvolvidas em vários países apontam que a abordagem terapêutica apropriada da DLC, com abordagem multidisciplinar incluindo fisioterapia, analgesia, suporte clínico-nutricional e intervenções como infiltrações e cirurgia, depende da identificação dos fatores distintos que causam a dor.^(8,9)

O desenvolvimento de edema no corpo de uma ou mais vértebras lombares está relacionado e documentado como fator de associação com episódios de dor lombar resistente a diversas modalidades de tratamento e pode levar ao desenvolvimento de DLC inespecífica.^(10,11) Além do mais, é um marcador independente de mau prognóstico clínico.^(10,11) Essas alterações foram primeiramente identificadas por de Roos et al.⁽¹²⁾ e posteriormente descritas, classificadas e associadas clinicamente por Modic et al.,^(13,14) passando a ser denominadas alterações de Modic. As chamadas alterações radiológicas de Modic são definidas como edema da medula óssea vertebral na região subcondral associado com degeneração das placas terminais vertebrais. Desde então, as alterações de Modic foram identificadas e descritas como fator causal para dor lombar em diversos estudos.^(15,16)

Modic et al.^(13,14) classificaram os achados das imagens da placa terminal na ressonância magnética em três tipos diferentes. Tipo I de Modic foi classificado como sinal hipointenso na janela T1 e hiperintenso na janela T2, representando edema ou inflamação da medula óssea. Tipo II de Modic foi definido como alterações de alta intensidade de sinal tanto na janela T1 quanto T2, representando degeneração gordurosa. Por fim, Modic tipo III foi classificado como sinal hipointenso nas imagens da ressonância magnética tanto em T1 quanto em T2, representando esclerose óssea subcondral.

Como foi definido por Modic et al., estresse e sobrecarga mecânica ou instabilidade provocam alterações de intensidade de sinal do disco intervertebral e placas terminais adjacentes à ressonância magnética que refletem edema e, conseqüentemente, inflamação.^(13,14) As alterações do tipo I de Modic estão associadas com ruptura e fissura das placas terminais assim como com a formação de tecido fibrovascular granular secundário à inflamação ativa.

Brown et al.⁽¹⁷⁾ identificaram defeitos nas placas terminais com aumento da densidade vascular e fibras neurais sensoriais relacionando-os com a dor lombar. Por outro lado, Burke et al.⁽¹⁸⁾ enfatizou que um aumento nos mediadores pró-inflamatórios, como a interleucina-6, interleucina-8 e prostaglandina E-2, nos discos de

pacientes foi um fator importante na patogênese da dor lombar discogênica. De acordo com Crock,⁽¹⁹⁾ trauma repetitivo no disco induz a produção de substâncias inflamatórias no núcleo pulposo. Estas toxinas migram por difusão para a placa terminal vertebral causando reação inflamatória local e dor lombar.

Alterações do tipo I de Modic (edema ósseo) na vértebra estão presentes em 6% da população geral e em 35-40% da população com dor lombar.⁽²⁰⁾ Kjaer et al.⁽²¹⁾ sugeriram que a doença degenerativa do disco com Modic tipo I é mais frequentemente associada com dor lombar. Mitra et al.⁽²²⁾ também notaram que o aumento nas alterações do tipo I de Modic estavam clinicamente associadas com piora dos sintomas de dor lombar.

A prevalência das alterações de Modic na coluna vertebral lombar em pacientes com doença discal degenerativa varia de 19 a 59% sendo os tipos I e II os mais comuns.⁽²³⁾ Alterações de Modic são mais prevalentes em pacientes com doença discal degenerativa mas são incomuns em pessoas assintomáticas sem degeneração do disco.^(21,24) Kjaer et al. notaram alterações de Modic em 9,6% de indivíduos sem doença degenerativa do disco e 34,1% daqueles com degeneração discal.⁽²¹⁾ Há que se considerar, porém, que pessoas sem dor naturalmente não procuram ajuda médica que leva ao exame por imagem, portanto é possível que pessoas com degeneração discal que seriam evidenciadas também com Modic não desenvolvam sintomatologia.

1.3 *Cutibacterium acnes* e inflamação

Cutibacterium acnes é um novo nome, cunhado em 2016, para a espécie de comensal da pele conhecida anteriormente como *Propionibacterium acnes*. A modificação na nomenclatura se deveu à transferência de isolados do gênero *Propionibacterium* para o filo Actinobacteria, com a simultânea descoberta de novas espécies e subespécies. A literatura pode ter demorado um certo tempo para absorver a nova taxonomia e nomenclatura, porém os dois nomes, *Cutibacterium acnes* e *Propionibacterium acnes*, se referem ao mesmo microrganismo. Nesta tese, preferimos o uso do nome atual, *Cutibacterium acnes*. O *C. acnes* foi também categorizado de acordo com filotipos (linhagens filogenéticas) de acordo com características de linhas evolutivas distintas. As principais definidas foram as do tipo IA, IB, II e III. A classificação foi ainda mais expandida com base em pesquisas com *multilocus sequence typing*

(MLST) e sequenciamento completo de genoma nos tipos IA1, IA2, IB, IC, II e III, que apresentaram diferenças clínicas e fenotípicas. Esses subtipos apresentam patogenicidades diferentes e podem estar associados com vários tipos de doenças. Os diferentes filotipos do *C. acnes* não foram alvo de análise nessa tese.^(25,26)

Cutibacterium acnes é uma bactéria anaeróbica aerotolerante, não formadora de esporos, Gram-positiva, microaerofílica, pleomórfica, em formato de haste. Está presente nos folículos pilosos e glândulas sebáceas da pele humana, cavidade oral, conjuntiva, trato intestinal e meato acústico externo.^(27,28) O *C. acnes* está concentrado nas costas e pescoço, axila e parede torácica, o que poderia possivelmente explicar seu envolvimento com doenças da coluna e do ombro. Homens tendem a ter concentrações mais altas de *C. acnes* comparados com mulheres.⁽²⁹⁾ Adicionalmente, a localização e a concentração do *C. acnes* podem variar de acordo com o pH, temperatura, umidade e o sebo na pele.^(23,30)

No entanto, o *C. acnes* foi identificado como organismo causador em várias outras infecções além da pele, como na derivação cérebro espinhal, infecção dentária, musculoesquelética, endocardite, infecções neurocirúrgicas, discite pós-operatória, espondilodiscite, infecção na coluna e infecção relacionada a implantes ortopédicos como em próteses articulares.⁽²⁸⁾ O *C. acnes* é subdiagnosticado e sub-reportado como um causador de infecção, ou por ser visto como um contaminante inofensivo ou por falha em promover condições adequadas de cultura.⁽²⁸⁾

O papel do *Cutibacterium acnes* (antigamente conhecido como *Propionibacterium acnes*) na patofisiologia da acne está bem estabelecido;⁽³¹⁾ entretanto, um número crescente de relatos tem relacionado esse organismo como um patógeno oportunista responsável por uma ampla gama de condições inflamatórias e infecção pós-operatória com ou sem implantes.⁽³²⁾ O microrganismo já foi isolado em lesões ateroscleróticas, cirrose biliar primária, câncer de próstata, sarcoidose, dor lombar e ciatalgia; síndrome de SAPHO (sinovite, acne, pustulose, hiperostose, osteíte).⁽²⁸⁾

Estudos mais recentes descrevem o *C. acnes* como um organismo causador da patogênese das alterações do tipo I de Modic.^(33,34) Alguns autores⁽²⁸⁻³⁰⁾ isolaram essa bactéria anaeróbia Gram-positiva de culturas de amostras de disco e acreditam que o ambiente anaeróbio do disco intervertebral promove o crescimento e proliferação do *C. acnes* naquele ambiente. Conforme explicado acima, o *C. acnes* faz parte da flora normal da pele e mucosa humana, o que inclui a cavidade oral, trato intestinal e canal externo do ouvido. Entretanto, uma falha na mucosa e um ânulo fibroso

rompido apresenta, em teoria, um caminho favorável para esta bactéria alcançar o núcleo pulposo, onde pode se proliferar sob condições anaeróbicas.⁽³³⁾ Os macrófagos podem situar o *C. acnes* e transportá-lo para o disco intervertebral por meio da circulação, liberando bactéria viável após morte celular em lugar onde há ambiente anaeróbico favorável para crescimento e proliferação.⁽³⁴⁾

1.4 Evidência da bactéria no disco intervertebral proposta como causa da dor

Durante a última década, alguns autores demonstraram que infecção intradiscal de baixa virulência em alguns pacientes desencadeia uma degeneração progressiva do disco e aparecimento de alterações de Modic.⁽³⁵⁾ Dados recentes reforçam a presença de infecção bacteriana no disco e foram publicados por alguns estudos microbiológicos tanto em humanos como em animais.^(35–37)

Em uma revisão recente publicada por Gilligan et al.⁽³⁸⁾ foram analisados 19 estudos publicados que investigaram a presença do *C. acnes* em discos intervertebrais humanos. Métodos diferentes para identificar a bactéria foram utilizados nesses estudos, levando a achados diferentes. A revisão concluiu que *C. acnes* foi encontrado em 12 estudos, enquanto os outros sete apenas identificaram traços da bactéria; estes foram considerados incidentais ou resultado da contaminação a partir da pele durante o procedimento cirúrgico. É interessante notar que apenas um desses estudos utilizou técnicas quantitativas atuais para identificar adequadamente a infecção por *C. acnes* e apresentar resultados positivos de infecção.⁽³⁹⁾

De acordo com a literatura, hipótese de origem infecciosa da DLC pode ser descrita em quatro fases sequenciais:^(34,38,40–42)

1. Dano mecânico ao disco, como uma hérnia, levando a dor lombar aguda ou dor radicular, como a ciática;
2. Infecção bacteriana do tecido discal herniado protuso, extruso ou sequestrado;
3. Reparo e resolução da hérnia, seja naturalmente ou por cirurgia, aliviando os sintomas de dor radicular em algum grau, com disseminação de infecção bacteriana no disco em alguns pacientes;
4. Como consequência de infecção bacteriana crônica não piogênica do disco e inflamação da vértebra adjacente, meses ou anos depois, há o

desenvolvimento de DLC, incapacitante e persistente, na ausência de dor radicular, e associado a presença de alterações de Modic na ressonância.

1.5 Estudos que relacionam *C. acnes* com a degeneração discal e alterações do tipo Modic tipo I

Nas últimas duas décadas, muitos autores identificaram o *C. acnes* em culturas rotineiras de discos. Conforme detalhado na revisão da literatura adiante, foi demonstrado que quase 50% das culturas de disco eram positivas para diversos organismos e, na grande maioria, o *C. acnes* foi o organismo primariamente isolado.

Stirling et al.⁽⁴³⁾ em 2001 encontraram 19 de 36 pacientes com culturas de disco positivas em sete dias. Eles demonstraram que bactérias, em particular o *C. acnes*, poderiam ser isoladas de tecido extruso de disco herniado em pacientes com dor radicular como ciática, mas não de controles de amostras sem degeneração (pacientes com escoliose, por exemplo, que tiveram amostras discais coletadas). Dos 19 casos, 16 (84%) eram para *C. acnes*, dois (11%) para estafilococos coagulase-negativos e um (5%) era *Corynebacterium propinquum*.

Dez anos depois, Agarwal et al.⁽⁴⁴⁾ reportaram sete culturas de disco positivas para *C. acnes* em 52 pacientes operados para tratamento de hérnia de disco com cirurgia primária de microdiscectomia. Um total de dez amostras (20%) apresentou culturas positivas, das quais 70% para isolamento do *C. acnes*. No ano seguinte, Arndt et al.⁽⁴⁵⁾ isolaram vários organismos de 40 culturas de disco positivas, com a maioria sendo pelo *C. acnes*. Um total de 83 pacientes com cultura de amostras de disco degenerado apresentou positividade em 48% delas, das quais 45% para isolamento do *C. acnes*.

Em seguida, Albert et al.⁽⁴⁰⁾ passaram a investigar a relação entre o *C. acnes* e alterações de Modic. No estudo, entre os discos com cultura positiva para bactéria anaeróbica, 80% desenvolveram alterações de Modic na placa terminal adjacente ao disco herniado em novos exames de ressonância. Em contraste, nenhum daqueles com cultura positiva para bactérias aeróbias e apenas 44% daqueles com culturas negativas desenvolveram alterações de Modic. A associação entre cultura positiva para bactéria anaeróbia e novas alterações de Modic foi estatisticamente

significativa. Dos 61 pacientes avaliados, 46% apresentaram cultura da amostra de disco degenerado positiva, sendo 54% desses para o *C. acnes*.

Os estudos seguintes na mesma década encontraram prevalências muito variadas de positividade para *C. acnes* no disco intervertebral. Zhou et al.⁽⁴⁶⁾ colheram amostras de disco degenerado de 46 pacientes e enviaram para cultura, sendo que 11 (24%) destas foram positivas, todas pelo *C. acnes*. Capoor et al.⁽³⁹⁾ realizaram um estudo em 290 pacientes adultos (média de idade de 47 anos) submetidos a microdiscectomia lombar para hérnia de disco, todos com a mesma técnica cirúrgica pela linha média posterior. Foi realizada cultura anaeróbia quantitativa e uma amostra foi congelada e usada para quantificação do genoma do *C. acnes* com reação de polimerase em cadeia (PCR – *polymerase chain reaction*). Foram identificadas bactérias em 130 das 290 amostras de disco. O limite inferior para disco com material abundante de *C. acnes* foi definido com mais de 1×10^3 CFU/mL para cada disco. Das 130 amostras com bactéria identificada, em 115 havia *C. acnes*, abundante (39 casos) ou não (76 casos). O número de genomas de *C. acnes* pelo PCR nas 115 amostras de disco positivas para *C. acnes* foi de dois a 5831 com mediana de 260 genomas por 500mg do total de DNA. Yuan et al.⁽⁴⁷⁾ colheram amostras de disco intervertebral de 76 pacientes com dor lombar e/ou ciática sem nenhum sintoma de quadro infeccioso (como febre, por exemplo). A cultura foi positiva para *C. acnes* em 16 amostras pelo 16S rDNA PCR e com prevalência de 21%.

1.6 Estudos refutando a hipótese da participação do *C. acnes* na degeneração do disco e alterações Modic

Estudos que não apoiam a hipótese em geral da participação de *C. acnes* nas alterações Modic simplesmente não o detectaram em nenhuma amostra ou justificam a sua presença como tendo origem em contaminação iatrogênica. Tal contaminação pode ocorrer em todo o processo da cirurgia ou do estudo, desde a coleta do tecido da amostra até o seu transporte para o laboratório ou mesmo durante o isolamento em vidraria de laboratório.

Dois trabalhos publicados em 2004 e 2006 tiveram resultados negativos para *C. acnes* e outro em 2007 atribuiu a presença de *C. acnes* à contaminação ambiental. Fritzell et al.⁽⁴⁸⁾ detectaram culturas positivas em amostras de

disco de dois pacientes de um total de dez (20%), sem detecção do *C. acnes*. Ben-Galim et al.⁽⁴⁹⁾ coletaram amostras de 30 pacientes e apenas duas (7%) delas foram positivas, sendo ambas por *Staphylococcus* coagulase-negativo. Não foi detectado *C. acnes* em nenhuma amostra. Carricajo et al.⁽⁵⁰⁾ coletaram amostras de 54 pacientes submetidos a cirurgia para hérnia de disco lombar e o *C. acnes* foi isolado em apenas dois fragmentos (3,7%). Além disso, culturas do ligamento amarelo e do músculo foram também realizadas como controle nestes dois pacientes e também foram positivas para *C. acnes*. O mesmo ocorreu em outras dez amostras controles. Amostras do ar no centro cirúrgico também foram coletadas durante a cirurgia e todas continham *C. acnes* (três de 54 controles do ar do fluxo laminar da sala cirúrgica durante o procedimento). A contaminação das amostras pareceu ser a causa mais provável da presença de *C. acnes* nas culturas do disco intervertebral.

Em 2016, Rigal et al.⁽⁵¹⁾ realizaram um estudo prospectivo em que todos os pacientes foram submetidos a procedimento vídeo-assistido de artrodese ou correção de prótese de disco nos níveis L4-L5 ou L5-S1. Eles compararam pacientes submetidos a abordagem anterior do disco com os que foram operados por via retroperitoneal para eliminar o risco de contaminação. Em 385 amostras de 313 pacientes (média 47,6 anos), a ressonância magnética demonstrou alterações do tipo Modic I em 303 (78,7%), Modic 2 em 58 casos (15,1%) e ausência de qualquer alteração de Modic em 24 casos (6,2%). Dos seis pacientes com cultura positiva, cinco tinham alterações de Modic tipo I e um paciente apresentava alterações de Modic tipo II. As culturas foram preservadas por quatro semanas em meio enriquecido e enviadas para análise histopatológica. Todas as seis amostras positivas foram originárias do disco de L5-S1. O exame histológico do disco apontou fibrose não específica de remodelamento do disco intervertebral sem sinais de resposta inflamatória aguda, similar a tecido de fibrocartilagem. Foi concluído então que as seis amostras positivas eram provavelmente resultado de contaminação e os autores enfatizaram que moduladores biológicos, assim como mecanismos biomecânicos e genéticos, são fatores para a degeneração. A ausência de infecção após um ano de seguimento foi um argumento adicional em favor da falta de relação entre infecção e degeneração discal.

Fritzell et al.⁽⁵²⁾ em 2019, coletaram amostras de disco de 40 pacientes adultos com hérnia de disco submetidos a cirurgia de descompressão e de 20 pacientes adolescentes com escoliose submetidos ao tratamento cirúrgico. Nesse estudo multicêntrico europeu, foram realizadas culturas da pele, ferida operatória, disco

e vértebra. Foi realizada análise do DNA das amostras por meio de sequenciamento do 16S rRNA por PCR. O fato de que as amostras foram positivas na pele e ferida corroboram a tese da contaminação. A análise de DNA bacteriano foi negativa em 98% das amostras de disco e vértebra. No grupo com hérnia de disco, 72% dos pacientes apresentaram pelo menos uma amostra com crescimento do *C. acnes*, comparados com 70% no grupo da escoliose. Não houve associação de alterações de Modic com o isolamento de bactéria. Diante dos resultados, os autores concluíram que o isolamento de *C. acnes* em amostras de disco e vértebras durante cirurgia de hérnia de disco em adultos com degeneração discal pode ser resultado de contaminação.

1.7 Eficácia de antibióticos orais para dor lombar crônica

O foco do tratamento da DLC com medicação sempre foi baseado no manejo de anti-inflamatórios não esteroidais, relaxantes musculares, opioides e neurotróficos. A hipótese de infecção do disco levou à realização de alguns ensaios clínicos por grupos de estudos independentes usando antibióticos orais para tratar paciente com DLC e alterações de Modic na ressonância magnética. Em geral, os estudos administram antibióticos por três meses de acordo com o usual para tratamento da espondilodiscite piogênica. O antibiótico pode esterilizar o disco durante o período de tratamento, mas leva tempo para o tecido adjacente se reestabelecer e tornar-se menos doloroso. Dois ensaios clínicos randomizados duplo-cego destacam-se.

Albert et al.⁽⁴⁰⁾ randomizaram 162 pacientes para receber tratamento com amoxicilina-clavulanato (Bioclavid; 1500/375 ou 3000/750mg por dia) por 100 dias ou placebo. Não houve diferença significativa entre os grupos randomizados e 90,7% dos pacientes completaram o seguimento de 12 meses com questionários. Todos os principais desfechos mensurados apresentaram melhora e foram estatisticamente significantes. No grupo tratado com antibiótico, o questionário de função de Roland-Morris apresentou melhora de 53,4% (dor lombar em 44,8% e dor na perna em 68%) enquanto o grupo placebo não apresentou nenhuma melhora em nenhum desfecho. O número de horas com dor no período de quatro semanas (máximo de 448 horas) caiu de 448 para 64 horas no grupo tratado com antibiótico, enquanto não houve redução no grupo placebo. Eventos adversos foram mais observados no grupo com antibiótico (65% dos participantes) do que no grupo placebo (23%), e foram principalmente queixas leves

gastroenterológicas. O exame de ressonância magnética realizado após um ano de seguimento apresentou diminuição significativa no volume das alterações de Modic no Grupo com Antibiótico, o que não aconteceu no Grupo Placebo.

O estudo de Bråten et al.⁽⁵³⁾ incluiu tanto pacientes com alterações de Modic tipo I (n=118) quanto outros com tipo II (n=62), e os resultados foram apresentados de maneira mista com os dois tipos. Os pacientes foram randomizados para uso oral de antibiótico 2250mg de amoxicilina por três meses ou placebo. O grupo que recebeu antibiótico apresentou melhora de 30,7% na escala numérica de dor (NRS – *numerical rating scale*) versus 17,5% no Grupo Placebo após um ano. Pacientes que receberam antibiótico com alteração de Modic tipo I apresentaram melhora funcional mais relevante do que aqueles com alteração de Modic tipo II. Pacientes do grupo placebo também apresentaram melhora com o tempo. Levando em consideração apenas os pacientes com Modic I, no grupo tratado com antibiótico, 50 pacientes (56%) tiveram pelo menos um evento adverso relacionado com a medicação. No Grupo Placebo, 31 pacientes (34%) relataram eventos adversos. Um ou mais eventos adversos sérios ocorreram em seis pacientes (7%) no grupo que recebeu antibiótico e em dois pacientes (2%) no Grupo Placebo; nenhum relacionado ao medicamento estudado. Apesar dos melhores resultados no grupo que recebeu antibiótico, os autores concluíram que não houve diferença clinicamente significativa no efeito da medicação nos pacientes com DLC já que a diferença de melhora pelo questionário de Roland-Morris entre os dois grupos foi menor do que quatro pontos após um ano de tratamento.

1.8 Objetivos

1. Investigar a prevalência de positividade para bactérias em cultura de tecido intervertebral de pacientes com hérnia de disco intervertebral lombar;
2. Verificar a presença específica da bactéria *C. acnes* nas amostras do disco;
3. Verificar a presença de outras bactérias nas amostras do disco;
4. Determinar a microbiota do disco intervertebral e sua possível esterilidade;
5. Avaliar fatores clínicos de prognóstico clínico dos pacientes com diagnóstico de infecção;

6. Avaliar a relação de alterações radiológicas (Modic tipo I e II) com a infecção um ano após a cirurgia de hérnia de disco.

2 MÉTODOS

2.1 Considerações éticas, de financiamento e publicação

O protocolo deste estudo foi aprovado em 10 de abril de 2017 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) (CAAE n.º 65102617.2.0000.0071; SGPP 2998-17). Para realização deste estudo, foram recrutados pacientes que procuraram o serviço do HIAE para tratamento de doenças na coluna. Os pacientes foram incluídos no estudo somente após coleta de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto foi submetido para a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2016/15830-7) e teve o financiamento de seus custos aprovado em março de 2017.

Apesar de ser um estudo observacional, de coorte, este projeto foi registrado prospectivamente na base *ClinicalTrials.gov* (NCT03158766) em maio de 2017. O projeto foi atualizado na plataforma pela última vez em 20 de setembro de 2021.⁽⁵⁴⁾

O protocolo do estudo foi publicado com livre acesso pelo *British Medical Journal Open* em julho de 2017 sob o título “*Subclinical Propionibacterium acnes infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort*”.⁽⁵⁵⁾ (Apêndice 1). O roteiro para redação de artigos científicos *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) guiou a redação deste capítulo.⁽⁵⁶⁾

2.2 Desenho do estudo e local

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo em centro único no HIAE, um hospital privado na cidade de São Paulo, Brasil. Foram recrutados todos os pacientes admitidos consecutivamente a partir de maio de 2017 para serem operados para tratamento de hérnia de disco lombar na instituição até que fosse completado o tamanho da amostra calculado para este projeto (conforme descrito adiante).

Os pacientes incluídos, previamente avaliados por ressonância magnética, foram entrevistados por meio de questionário elaborado. Eles foram operados entre junho de 2017 e setembro de 2019 e tiveram amostras do tecido discal coletadas no momento da cirurgia para avaliação microbiológica. Esta coorte de pacientes foi seguida prospectivamente por um ano após o procedimento cirúrgico, quando foram convocados a fazer nova ressonância magnética da coluna lombossacra e avaliação clínica geral.

2.3 Participantes: recrutamento e inclusão no estudo

A avaliação de elegibilidade dos pacientes foi realizada pelo investigador principal ou por um pesquisador colaborador, incumbido de confirmar critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir. Quando o paciente optou em participar, o pesquisador lhe apresentou todo o estudo, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que assinasse e datasse, afirmando seu desejo e capacidade de participar de todas as etapas da investigação clínica e reabilitação. Uma cópia do termo foi anexada ao prontuário do paciente e a outra entregue ao paciente. Na incapacidade do paciente em assinar o termo de consentimento escrito, o pesquisador ofereceu explicações e orientações de maneira oral, e após consentimento oral, uma testemunha presente assinou o termo. Pacientes que se recusaram a assinar o termo não foram incluídos no estudo.

Foram incluídos no estudo pacientes entre 18 e 65 anos de idade, de ambos os sexos, com diagnóstico de hérnia de disco lombar, a serem submetidos a cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta (microdiscectomia). A cirurgia foi recomendada pelo cirurgião assistente quando identificada hérnia de disco (pelo exame de ressonância magnética) comprimindo nervo e gerando ciatalgia, independentemente da caracterização da inflamação no exame de imagem.

Não foram incluídos no estudo pacientes submetidos previamente a outra cirurgia de coluna lombossacra em qualquer momento da vida; os que foram submetidos a infiltração do disco e/ou discografia prévia ao tratamento cirúrgico; pacientes submetidos ou com indicação de cirurgia endoscópica para retirada da hérnia de disco; pacientes submetidos a artrodese da coluna no mesmo momento da cirurgia de hérnia de disco. Também não foram incluídos pacientes em uso de quimioterapia;

imunocomprometidos; com história de infecção bacteriana em outro sistema seis meses antes da cirurgia ou com uso de antibiótico nos últimos dois meses; pacientes com dados do formulário específico incompletos.

De acordo com o protocolo, o paciente seria excluído do estudo nos seguintes casos:

- Retirada do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, mesmo que posterior à inclusão no estudo;
- Óbito;
- Sintomas clínicos de infecção como dor importante lombar ou radicular, febre sem outros focos identificados, com alteração de exames de velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína-C reativa e leucograma alterado, e exames de imagem que comprovassem necessidade de interromper o mascaramento dos resultados dos exames de cultura.

Para cada caso retirado do estudo, foram registrados os motivos e circunstâncias que o levaram a tal. Os dados do paciente coletados até a data da saída do estudo foram utilizados na análise final.

2.4 Tratamento recebido por todos os pacientes

Todos os pacientes compondo esta coorte foram operados pelo princípio da descompressão do canal lombar com discectomia. O método e técnica cirúrgica utilizada foram decididos pelo cirurgião assistente de acordo com sua experiência e preferência e em comum acordo com o paciente, mas em linhas gerais seguiu o descrito abaixo.

De acordo com o princípio tradicional da cirurgia de discectomia lombar, o paciente sob anestesia geral é colocado em posição prona semiflexionada na mesa de cirurgia, onde é realizada tricotomia da região lombar seguida de assepsia da pele com degermação com clorexidina por dois a cinco minutos. A antisepsia é completada com o isolamento da área lombar a ser operada com campos cirúrgicos estéreis. O nível operatório é identificado por radioscopia, utilizando-se uma agulha espinhal e fluoroscopia. Pequena incisão paramediana de 2cm é feita longitudinal lateralmente à linha média no lado da hérnia de disco lombar. A incisão varia de dois a quatro centímetros de acordo com o cirurgião e o tipo de afastamento. A dissecação

subcutânea é realizada até a fáscia, que é incisada para acesso ao plano intermuscular. Por meio de dilatadores sequenciais, o plano intermuscular até a lâmina óssea vertebral é criado e um afastador ou retrator tubular ou afastadores ou separadores laterais com apoio no processo espinhoso no nível a ser operado é posicionado, guiado por radioscopia intraoperatória. Nesse momento, o cirurgião será auxiliado por magnificação visual proveniente de microscópio ou lupas cirúrgicas assim como respectiva iluminação focal. Uma vez exposta a lâmina óssea vertebral do nível a ser operado, é realizada laminotomia parcial (hemilaminectomia) com broca óssea ou pinça Kerrison no arco posterior das vértebras para exposição do ligamento amarelo.

Para este estudo, o ligamento amarelo foi então removido em peça única após liberação das superfícies laminares cefálica e caudal com cureta e enviado como tecido controle para cultura. Em seguida, após passagem pelo ligamento amarelo, é realizada a dissecação do saco dural e sua retração para acesso ao disco intervertebral. A parede medial do pedículo caudal é identificada e a raiz nervosa transeunte suavemente retraída. O fragmento extruso ou protuso do disco intervertebral é retirado para descompressão dos nervos. A discectomia envolve a remoção do fragmento destacado apenas junto com os fragmentos soltos restantes dentro do disco. As amostras de disco coletadas são encaminhadas para cultura e patologia. O tamanho da anulotomia foi reduzido ao mínimo possível.

Após completada a dissecação e a liberação do nervo e assegurada a hemostasia, e antes de ser finalizada a cirurgia com fechamento da via de acesso, amostras do músculo multífido foram coletadas e enviadas para análise de cultura. O fechamento da ferida subcutânea foi feito com sutura contínua de vicryl® 2-0, seguido de fechamento da pele e curativo.

O tempo de cirurgia foi calculado pelo pesquisador com o horário de início e final da operação registrados em formulário eletrônico. Nenhuma cirurgia foi gravada. O pesquisador esteve presente durante todas as cirurgias mesmo que não fosse o cirurgião responsável pelo paciente, para assegurar que a mesma técnica cirúrgica e os mesmos procedimentos de coleta tecidual fossem utilizados em todos os casos.

Todos os pacientes realizaram tratamento coadjuvante após a cirurgia com um mínimo de dez sessões de fisioterapia pós-operatória, conforme o protocolo descrito no apêndice 1, e orientados a manter os exercícios aprendidos na sua rotina

domiciliar. O uso de medicamento para dor foi livre, e de acordo com o médico assistente do paciente.

Amostras de sangue para análise de leucograma, VHS e proteína C-reativa foram coletadas no pré-operatório e após um, seis e 12 meses da data da cirurgia.

2.5 Avaliações

2.5.1 Questionários

Os questionários de dor (NRS),⁽⁵⁷⁾ função (Oswestry)⁽⁵⁸⁾ e qualidade de vida EuroQol-5D (EQ-5D), em suas versões traduzidas para a língua portuguesa^(59,60) foram aplicados antes da cirurgia e nas consultas de retorno, realizadas após um, três, seis e 12 meses após o procedimento cirúrgico, com um desvio aceitável de sete, 14, 21 e 28 dias respectivamente.

A administração dos questionários foi feita por uma assistente de pesquisa, que poderia ser uma secretária do consultório ou uma enfermeira. Uma delas, conforme o caso, entregou aos pacientes os questionários impressos dentro de envelopes para serem respondidos, sem ajuda, em casa, e devolvidos nos mesmos envelopes no dia da consulta de retorno com o médico. Uma forma alternativa de aplicação do questionário, principalmente durante o período de redução do serviço presencial devido à pandemia de COVID-19, foi o envio dos questionários por correio eletrônico para o paciente preencher em casa, devolvendo também por correio eletrônico.

2.5.2 Exame de imagem

Exames de ressonância magnética para diagnóstico da hérnia de disco foram realizados no pré-operatório e após 12 meses do procedimento cirúrgico.

Os exames de ressonância magnética foram realizados em aparelhos das marcas Siemens e General Electric, todos com a potência de 1,5T (mesma qualidade de imagem). Os modelos utilizados durante o estudo foram Siemens Aera ou Espree, GE Sign HDxt, Optima 450w ou Artist. Foram utilizadas as seguintes imagens:

- No plano sagital: o *fast spin-echo* ponderado em T1, T2 e T2 com saturação de gordura ou *short tau inversion recovery* (STIR), conforme protocolo institucional adotado em todos os exames;

- No plano coronal: foram utilizadas imagens na mesma sequência para a mensuração.

Faz parte do protocolo institucional de acompanhamento dos pacientes operados o uso de contraste no exame de ressonância magnética. Portanto, estas sequências pós-operatórias tiveram uso de contraste, embora o contraste não seja necessário para a análise de imagem neste estudo.

A mensuração e classificação das lesões foram realizadas por dois radiologistas experientes em imagens de ressonância magnética do sistema musculoesquelético. As avaliações foram feitas de forma independente, com previsão para reunião de consenso caso houvesse conflito. Os radiologistas trabalharam na identificação da hérnia e na avaliação das lesões de acordo com o sistema Modic, conforme descrito adiante, quantificando e medindo, conforme ilustrado na figura 2, as alterações do tipo Modic.



Figura 2. Método de mensuração radiologia do tamanho da alteração de Modic de acordo com altura e largura no corte sagital em imagem do banco de dados deste estudo

2.5.3 Coleta de material tecidual para análise histológica e microbiológica

Os pacientes incluídos no estudo, após terem sido anestesiados de forma habitual para a cirurgia, passaram por processo de preparo pré-incisão de degermação e antissepsia com soluções de clorexidina. Todos os pacientes receberam antibiótico profilático intravenoso no exato momento da incisão de pele (cefuroxima, 1,5g, ou em até uma hora antes da incisão, antes da indução anestésica, e previsão de 750mg administrados a cada quatro horas no intraoperatório e a cada oito horas no pós-operatório). Durante a cirurgia, foram coletados tecidos para análise de forma padronizada. Para cada amostra coletada, um conjunto de pinças esterilizadas foi aberto e utilizado neste estudo, de maneira que a contaminação de amostras e fragmentos fosse minimizada.

Foram retirados quatro fragmentos de cada tecido: um do ligamento amarelo (no início da cirurgia), dois do disco intervertebral herniado (em tratamento) e um do músculo multifídio (ao final da cirurgia), conforme demonstrado na figura 3. O primeiro fragmento de cada tecido foi colocado em frasco universal estéril (tubo seco). O segundo e terceiro fragmento foram colocados em tubo contendo tioglicolato (Merck, Rio de Janeiro) para culturas aeróbia e anaeróbia, contendo 20 esferas de vidro em cada tubo. O quarto fragmento, coletado do disco, foi enviado para a análise histológica de rotina (conforme protocolo cirúrgico). O fluxograma do processo de coleta de amostras para envio para cada tipo de análise encontra-se descrito na figura 4.

Um funcionário do laboratório de microbiologia estava presente na sala cirúrgica em todas as cirurgias para coletar e levar as amostras nos tubos em até 30 minutos para serem processados conforme descrito a seguir. Por questões logísticas, as amostras eram levadas ao laboratório ao mesmo tempo, entretanto, quando houve durante a cirurgia mais de 30 minutos entre a coleta de uma amostra e outra, estas foram enviadas em tempos diferentes em mais de uma saída para o laboratório. Uma das amostras do tecido do disco foi coletada em tubo OMNIgene-GUT (DNA Genotek, Ontario, Canada), para preservar sua microbiota, e foi alocado em temperatura -80°C até a extração do DNA e sequenciamento pelo teste *next generation sequencing* (NGS) conforme descrito adiante. Foram realizadas três culturas do disco intervertebral, três culturas do ligamento amarelo e três culturas do músculo multifídio de cada paciente.

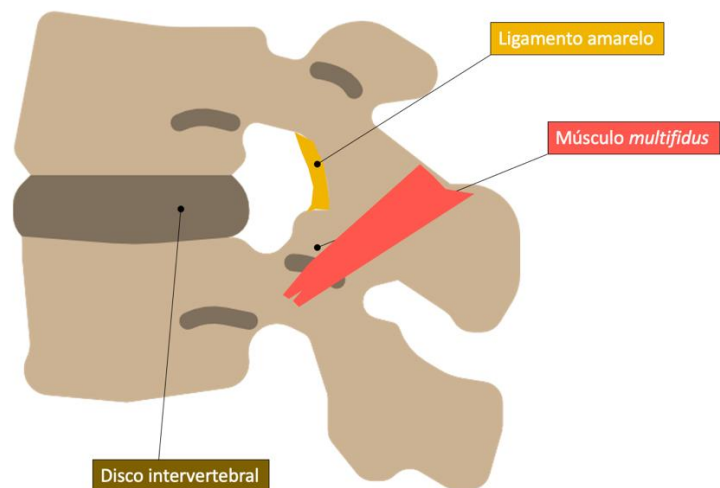


Figura 3. Localização dos pontos de retirada de amostras teciduais durante a cirurgia para tratamento de hérnia do disco intervertebral

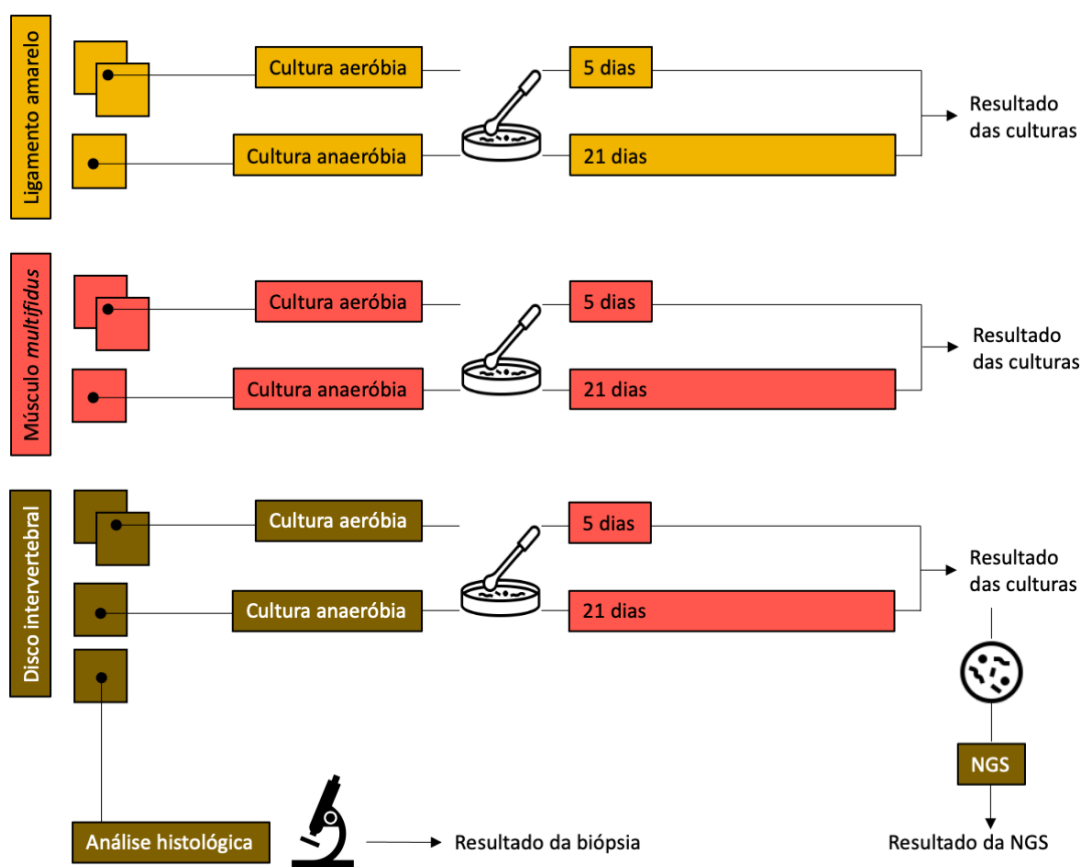


Figura 4. Uso das amostras teciduais coletadas de cada tecido

2.5.4 Análise histológica

O fragmento de disco herniado (2 x 2 x 5mm) a ser enviado ao laboratório de anatomia patológica foi colocado em frasco universal contendo formol tamponado a 10% ainda no centro cirúrgico. No laboratório, foi processado em graduação crescente de álcool, diafanizado em xilol e incluído em parafina (60-65°C). Foi processado para coloração de hematoxilina-eosina (HE) e coloração de Gram para confirmação da identificação do tecido e análise da presença de malignidade.

Para HE, foram realizados cortes de 4µm e realizada desparafinização com xilol por dez minutos duas vezes. Em seguida, os fragmentos foram hidratados com álcool em concentrações crescentes e corados com hematoxilina por cinco minutos, água corrente por cinco minutos, eosina por um minuto e água corrente por dois minutos e aplicado em meio para montagem da lâmina Entellan.

Para a análise de Gram, outra lâmina foi coberta com cristal de violeta por um minuto, lavada em água corrente por um minuto e coberta com lugol por um minuto, seguida de nova lavagem em água corrente. Realizou-se o descoramento da lâmina com álcool 95% por dez segundos, água corrente e depois coloração com fucsina por 30 segundos, lavagem em água corrente, secagem e aplicação de meio para montagem de lâminas Entellan.

2.5.5 Pesquisa de microrganismos: culturas

Os três fragmentos do disco intervertebral herniado coletados durante a cirurgia para pesquisa de microrganismo tinham aproximadamente 2 x 2 x 5mm. Eles foram macerados dentro de capela de fluxo laminar até obtenção de conteúdo homogêneo. O mesmo procedimento foi efetuado com o ligamento amarelo e músculo multifídio.

Foram seguidos critérios similares dos utilizados para detecção de infecção em artroplastias da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA – *Infectious Diseases Society of America*), que recomenda que pelo menos duas culturas (aeróbia e anaeróbia) sejam positivas com mesmo patógeno para confirmar infecção.⁽⁶¹⁾ O método é utilizado para caracterização de patógenos isolados de fragmentos de disco

intervertebral herniado.⁽²⁵⁾ As culturas aeróbia e anaeróbia foram realizadas conforme detalhado a seguir.

Para cultura aeróbia, as amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5%, ágar chocolate e MacConkey e incubadas em estufa a 35°C (atmosfera suplementada com CO₂) por um período de cinco dias. Em caso de positividade e crescimento bacteriano em placa, a colônia foi identificada por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) Microflex LT (Bruker Daltonics/BD). O perfil de sensibilidade foi realizado, quando aplicável, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Para a cultura anaeróbia, a amostra foi semeada em tubo de tioglicolato e incubada em estufa a 35°C por um período de até 21 dias. Caso ocorresse a turvação do meio de tioglicolato, o material seria semeado em ágar sangue anaeróbio e incubado em estufa a 35°C em atmosfera de anaerobiose. Após crescimento em placa, o isolado foi identificado por MALDI-TOF e, quando aplicável, realizado teste de sensibilidade aos antimicrobianos seguindo as recomendações do CLSI.

2.5.6 Identificação molecular dos patógenos: sequenciamento de nova geração

As culturas positivas que apresentaram crescimento de patógenos aeróbios ou anaeróbios tiveram os isolados armazenados em *freezer* a -80°C para posterior análise molecular para sua identificação. Foi realizada a tipagem molecular pela técnica de *pulsed field gel electrophoresis* dos isolados de acordo com o protocolo descrito por Oprica et al.⁽⁶²⁾ utilizando a enzima de restrição SPe-I e utilizando o *software* BioNumerics (bioMérieux, Holanda) para análise dos resultados. Esta análise foi realizada para identificar o patógeno (espécie e gênero).

Durante a realização deste estudo, tornou-se disponível no hospital uma tecnologia de rastreamento da sequência de DNA da amostra que não estava prevista no protocolo original do trabalho, a NGS. Por ser capaz de detectar restos de DNA bacteriano, tem sensibilidade muito superior na detecção do patógeno no material em comparação com a cultura tradicional de tecidos, fornecendo microbioma completo. Visto que a aplicação desta tecnologia para o tecido do disco intervertebral é nova e sem publicação pregressa na literatura, o grupo desenvolveu e validou a aplicação do NGS

para esta finalidade. Esta validação foi publicada na literatura durante o desenvolvimento desse projeto⁽⁶³⁾ (Apêndice 2).

Como este novo teste foi disponibilizado durante o transcorrer deste estudo, uma nova submissão ao CEP foi enviada e aprovada, e o teste foi aplicado nos últimos 17 pacientes incluídos, juntamente com os outros métodos apresentados de identificação de patógenos descritos anteriormente.

Em síntese, o NGS foi realizado com extração do DNA, realização de PCR, purificação e indexação dos genes bacterianos encontrados, verificação do tamanho e quantificação da biblioteca e sequenciamento, conforme detalhado a seguir:

- Extração do DNA: o DNA genômico foi extraído utilizando o *kit* Qiagen DNA Microbiome (Qiagen, Venlo, Holanda), de acordo com as instruções do fabricante. O volume inicial de cada amostra para a extração foi de 1mL e o DNA extraído foi efluído em 50µL de tampão AVE. Este *kit* depleta DNA do hospedeiro e aumenta o rendimento de DNA bacteriano;

- Realização de PCR para amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA: as regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene 16S rRNA foram amplificadas utilizando o *kit* QIAseq 16S/ITS Region Panels (Qiagen, Venlo, Holanda). Antes da reação de PCR foi verificada a concentração de cada amostra de DNA por fluorimetria, utilizando-se o equipamento Qubit Fluorometer 4.0 (Invitrogen Co., Waltham, Estados Unidos) com o kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Estados Unidos) de acordo com as informações do fabricante. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 1ng/µL. Para a amplificação das sequências-alvo, foram utilizados 5,0µL do DNA a 50ng/µL, 2,5µL de UPC Master Mix, 1µL de Region Panel e 1,5µL de água UPC PCR, obtendo um volume total de 10µL. A reação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por cinco minutos, seguida de 12 ciclos de desnaturação 95°C por 30 segundos, “anelamento” 50°C por 30 segundos, 72°C de extensão por dois minutos, uma extensão final de 72°C por sete minutos e mantidas a 4°C;

- Purificação da região V3-V4 do gene 16S rRNA ampliado: para o processo de purificação, foram adicionados 40µL de água UPC PCR e 55µL de QIAseq *beads* por reação, seguido de duas lavagens com 200µL de etanol 80%. Após as lavagens, os *amplicons* purificados foram diluídos em 35µL de água UPC PCR;

- Indexação dos *amplicons* purificados: aos *amplicons* purificados foram adicionados *indexes* e adaptadores de sequenciamento utilizando o *kit* QIAseq 16S/ITS *index* (Qiagen, Venlo, Holanda), através da reação: 12,5µL de UPC Master Mix,

5µL de água UPC e 32,5µL do *amplicon*, para uma reação final de 50µL. A reação final foi adicionada em uma placa contendo os adaptadores e incubada nas seguintes condições: 95°C por dois minutos, seguida de 19 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, 72°C de extensão por dois minutos, uma extensão final de 72°C por sete minutos e mantidas a 4°C;

- Purificação dos *amplicons* indexados: a etapa de purificação foi realizada com 45µL de QIAseq *beads* por reação, seguida de duas lavagens com 200µL de etanol 80%. Após as lavagens, as bibliotecas purificadas foram diluídas em 30µL de água livre de nuclease;

- Verificação do tamanho e da quantificação da biblioteca: o perfil do tamanho dos fragmentos foi avaliado no equipamento Agilent 2200 TapeStation (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos), utilizando a High Sensitivity D1000 Screen Tape (Agilent). A quantificação foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Estados Unidos), utilizando o *kit* QIAseq Library Quant Assay (Qiagen, Venlo, Holanda);

- Equimolarização das bibliotecas para sequenciamento: nesta etapa, todas as bibliotecas foram ajustadas para 2nM baseado nas quantificações com o *kit* QIAseq Library Quant Assay (Qiagen, Venlo, Holanda), para que todas tivessem representação equimolar no *pool* para sequenciamento. Após a diluição, 5µL de cada biblioteca foram transferidos para um novo tubo Eppendorf LoBind de 1,5mL para o preparo do *pool* de sequenciamento;

- Sequenciamento: para a desnaturação do *pool*, foi realizada a combinação de 5µL do *pool* a 2nM com 0.2N de NaOH. Após a desnaturação, foram adicionados 990µL do tampão HT1 (Illumina, San Diego, Estados Unidos) para uma concentração do *pool* de 10pM. Ao *pool* a 10pM foram adicionados 10% de Phix (Illumina, San Diego, Estados Unidos) e esse *pool* foi submetido ao sequenciamento na plataforma NextSeq (Illumina, San Diego, Estados Unidos) com o *kit* Miseq Reagent V3 (600 ciclos) (Illumina, San Diego, Estados Unidos);

- Análise do sequenciamento por bioinformática: após o sequenciamento, as sequências geradas foram analisadas utilizando o *pipeline* QIIME. Porém, este método não apresentou bons resultados devido ao baixo número de leituras. Então, a classificação taxonômica das leituras foi realizada utilizando o *software* Geneious Prime (Geneious Prime 2020.1.2, Boston, Estados Unidos), de acordo com o protocolo padrão *16S Biodiversity Tool*. Posteriormente, as leituras pareadas foram

sobrepostas utilizando o *plugin* FLASH e as sequências de baixa qualidade e com menos de 50 pares de bases foram filtradas e submetidas a classificação taxonômica utilizando a ferramenta RDP versão 2.12.⁽⁶⁰⁾ Todas as análises do microbioma foram feitas em duplicata para assegurar que todas as leituras fossem mapeadas corretamente. O disco intervertebral é geralmente conhecido por ser teoricamente estéril ou com pouca colonização de bactéria. No entanto, para aumentar a amplificação das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA foram utilizadas concentrações diferentes de DNA nas reações de PCR. Para o controle de qualidade do teste foi incluído o controle comercial de uma comunidade microbiana padrão da ZymoBIOMICS (Zymo Research, Orange, Estados Unidos), e os resultados de nossas análises foram consistentes com o esperado do padrão;

- Análise estatística do sequenciamento: para reportar os dados, foi utilizada análise descritiva. A classificação taxonômica foi demonstrada em formato de gráficos e o microbioma do disco foi reportado em porcentagem de acordo com a frequência de patógenos. Para assegurar que a quantidade de bactérias mapeadas fosse significativa, um valor mínimo de corte de 20 leituras foi considerado.⁽⁶⁴⁾

2.6 Mascaramento

Os resultados dos exames da pesquisa de micro-organismos feitos para este estudo não foram incluídos no sistema de prontuários eletrônicos do hospital. Desta forma, foram ocultos do paciente, do cirurgião assistente e de outros profissionais envolvidos com a pesquisa. Somente o pesquisador principal teve acesso aos resultados microbiológicos, recebidos diretamente do laboratório e sem conexão a prontuários. O médico assistente também não teve acesso aos resultados dos questionários de avaliação funcional. O mascaramento do médico assistente só seria quebrado caso o paciente desenvolvesse sinais e sintomas claros de infecção requerendo tratamento.

O radiologista que avaliou os exames de ressonância magnética também não teve acesso aos dados clínicos do paciente, pois realizou as análises de forma independente do sistema de prontuários eletrônicos e sem acesso aos resultados da microbiologia.

Após receber os questionários dos pacientes, uma das assistentes de pesquisa tabulou os dados em planilha eletrônica de forma independente do cirurgião

assistente ou dos pesquisadores. O sistema de auditoria de pesquisa do hospital auditou a digitação destes dados. A tabela de dados fornecida para a análise estatística não continha dados ou informações que identificasse qualquer um dos participantes.

2.7 Definição dos desfechos

2.7.1 Desfechos primários

O objetivo principal do estudo considerou que o disco intervertebral estaria infectado por algum patógeno de baixa virulência e que promoveria o aparecimento de alterações de Modic e DLC. Para tal, foi realizado o cálculo de taxa de incidência de infecção (TII) do disco intervertebral lombar (número de casos de infecção sobre número de pacientes na coorte). Este foi considerado o desfecho primário investigado nesta pesquisa.

A TII foi calculada da seguinte forma:

$$TII = \frac{(\text{número de infecções presentes})}{(\text{número total de pacientes})}$$

Para ser considerado como um caso de infecção, o paciente deveria apresentar positividade na cultura das amostras de disco intervertebral em pelo menos duas das três amostras enviadas, assim como apresentar negatividade nas culturas dos tecidos controles de ligamento amarelo e músculo multifídeo.

Um paciente que apresentasse positividade das amostras do disco, porém com positividade simultânea das amostras de ligamento e/ou músculo, foi considerado como um caso em que a infecção das amostras provavelmente ocorreu durante o estudo, ou seja, por contaminação proveniente dos outros tecidos ocorrendo pela manipulação cirúrgica (intraoperatória) ou durante coleta das amostras.

2.7.2 Desfechos secundários

Além do desfecho principal, seis outros desfechos secundários foram estudados: dor lombar, qualidade de vida, função, incidência de alterações na imagem tipo Modic e seu volume e tamanho e eventos adversos do tratamento cirúrgico. A forma de avaliação de cada um destes desfechos está detalhada a seguir:

1. Dor lombar: a intensidade de dor lombar e a limitação para atividades diárias em pacientes com e sem infecção foi avaliada por meio de NRS aplicada no momento de recrutamento do paciente e após um, três, seis e 12 meses do procedimento cirúrgico. A NRS e a escala visual analógica (VAS) correlacionam-se bem e são igualmente sensíveis para avaliar dor após cirurgia.⁽⁶⁵⁾ A NRS é fácil de administrar e codificar e menos erros ocorrem no registro dos resultados em comparação com a VAS.⁽⁶⁶⁾ O escore resultante vai de zero a 10 pontos, com valores maiores indicando mais dor. Por ser mais fácil de preencher,⁽⁶⁶⁾ é preferida pelos pacientes.⁽⁶⁷⁾ A diferença mínima clinicamente importante foi considerada como de 2 pontos;⁽⁶⁸⁾

2. Qualidade de vida: a qualidade de vida foi avaliada com questionário EQ-5D versão 3L, validado para o português, aplicado no momento do recrutamento do paciente e após um, três, seis e 12 meses do procedimento cirúrgico.⁽⁶⁰⁾ O EQ-5D é um instrumento padronizado autopreenchido que consta de cinco itens: mobilidade, autocuidado, atividades usuais, dor e ansiedade/depressão. Cada domínio tem três níveis de resposta. O escore final (índice EQ-5D) foi quantificado de 0 a 1 de acordo com a orientação de cálculo dos desenvolvedores deste instrumento. Comparado ao instrumento *Short-Form 36* (SF-36), apresenta a vantagem de ser muito mais curto e rápido de analisar e avaliar.⁽⁵⁸⁾ A diferença mínima clinicamente importante foi considerada como de 0,3 pontos;⁽⁶⁹⁾

3. Avaliação da função: a função foi avaliada por meio do questionário de Oswestry para dor lombar, validado para o português,⁽⁵⁸⁾ que contém 10 perguntas. O questionário foi aplicado no momento do recrutamento do paciente e após um, três, seis e 12 meses do procedimento cirúrgico. O índice de incapacidade de Oswestry (ODI – *Oswestry Disability Index*) é um instrumento específico para avaliação da função em casos de alterações na coluna, em que são avaliadas dez atividades da rotina diária ou “seções”, com seis alternativas de resposta para cada atividade. Quanto mais alto o valor

na escala, que vai de zero a 100, mais incapacitado está o paciente. A diferença mínima clinicamente importante foi considerada como de 10 pontos;⁽⁷⁰⁾

4. Incidência de alterações do tipo Modic: foi avaliado se havia alterações de imagem Modic no momento antes da cirurgia e o aparecimento e/ou mudança do tipo de Modic nos pacientes operados após um ano da cirurgia;

5. Volume e tamanho de alterações Modic: o volume (mm^3) e o tamanho (mm) das modificações tipo Modic na ressonância foram mensuradas por dois radiologistas experientes em sistema musculoesquelético. Foram avaliadas e comparadas as imagens adquiridas no pré-operatório e com 12 meses após a cirurgia. Foram avaliadas na placa terminal superior e placa terminal inferior do disco. Foram comparados com o exame pré-operatório que serviu como linha de base para análise;

6. Efeitos adversos: foram registrados eventos como falha do tratamento cirúrgico (recidiva; instabilidade; necessidade de nova intervenção etc.); infecções superficiais; fístulas; trombose venosa profunda, e qualquer outro evento adverso.

2.7.3 Variáveis de confusão

As seguintes variáveis foram consideradas como de confusão: idade, gênero, consumo de álcool, tabagismo, índice de massa corpórea (IMC), realização de infiltração com corticoide até seis meses antes da cirurgia, uso de corticoides orais até três meses antes da cirurgia e diabetes. Como essas informações poderiam variar ao longo do tempo, foram considerados os valores da última avaliação antes do procedimento cirúrgico.

O consumo de álcool foi categorizado como ausente (não consome ou consome esporadicamente) quando era de menos que um copo ou taça/dia; consumo leve (um a dois copos ou taça/dia); consumo moderado-alto (três ou mais copos ou taça/dia) e não avaliado.⁽⁷¹⁾

O paciente foi categorizado, quanto ao tabagismo, simplesmente em ex-fumante; fumante; não fumante; ou não informado.⁽⁷²⁾

Na avaliação do IMC, o paciente foi categorizado como de baixo peso ($<18,5\text{kg/m}^2$); peso normal ($18,5 - 25\text{kg/m}^2$); com sobrepeso ($25 - 30\text{kg/m}^2$); obeso ($>30\text{kg/m}^2$); não registrado ou não informado.⁽⁷³⁾

2.8 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho amostral levou em consideração a estimativa da incidência de infecção de baixa virulência em pacientes com hérnia de disco lombar. Assumindo que 46%⁽⁷⁴⁾ de pacientes com DLC inespecífica apresentam alterações de Modic à ressonância magnética e que a alteração de Modic pode ser uma expressão dessa presença da bactéria provocando baixa inflamação, antecipamos que o número mínimo de pacientes a serem acompanhados seria de 95 para a construção de um intervalo de confiança de 95% com precisão absoluta de 10% e com nível de significância de 5%.

Ficou estabelecido que o recrutamento de pacientes ocorreria por 24 meses ou até que se completasse a amostra de 95 pacientes (n calculado segundo detalhado no item cálculo amostral), o que ocorresse primeiro.

2.9 Análise estatística

Variáveis qualitativas foram descritas por frequências absolutas e porcentagens, e variáveis quantitativas foram descritas por médias e desvios-padrão, medianas e quartis, além de valores mínimo e máximo. A combinação de medidas resumo mais apropriada para cada variável foi destacada nas tabelas e a conclusão foi obtida a partir do estudo da distribuição das variáveis, feito por gráficos *boxplots*, histograma, gráficos de comparações de quartis e testes de normalidade de Shapiro-Wilk.

As comparações entre grupos foram feitas por testes t de Student ou testes não paramétricos de Mann-Whitney para variáveis quantitativas e por testes de qui-quadrado ou testes exatos de Fisher para variáveis categóricas.

A incidência de infecção de baixa virulência foi obtida com a divisão do número de casos positivos no exame bacteriológico do material cirúrgico pelo número total de pacientes, e as estimativas foram acompanhadas de intervalos de confiança de 95%. Após a identificação dos casos de infecção, foi investigado se havia associação entre a presença de infecção e os desfechos dos pacientes por meio de modelos de regressão logística para o desfecho Modic, modelos de regressão logística ordinal para o desfecho volume e tamanho de Modic e por meio de modelos de regressão linear ou

modelos lineares generalizados para os desfechos numéricos; a saber: dor lombar, qualidade de vida e função.

Comparações pré e pós-cirurgia quanto ao aparecimento, tamanho ou mudança do tipo de Modic foram feitas por teste de Wilcoxon para dados pareados, considerando somente os pacientes que permaneceram no estudo após um ano (não perdidos). Para as comparações de medidas ao longo do tempo entre grupos, utilizamos modelos de equações de estimação generalizada com distribuição Tweedie ou Normal.

Todos os modelos consideraram como variáveis de confusão o tabagismo, a presença de diabetes, a realização de infiltração de corticoide e o IMC, além de gênero do paciente, idade e consumo de álcool. Os resultados foram apresentados por estimativas de efeito como razões de chances ou razões de médias e intervalos de confiança de 95% além de valores-p para as comparações múltiplas entre momentos e grupos, que foram corrigidas pelo método de Bonferroni sequencial.

Para a análise do estudo transversal, foram utilizados os dados de todos os pacientes incluídos e que foram submetidos a coleta de tecidos para cultura. Para o estudo de coorte, sobre alterações tipo Modic, foram incluídos somente os pacientes que retornaram para acompanhamento um ano após a cirurgia para realização de ressonância magnética (análise de casos completos).

As análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS⁽⁷⁵⁾ e considerando nível de significância 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Descrição dos pacientes

No período de maio de 2017 a setembro de 2019, dentre os pacientes consecutivamente admitidos no serviço para atendimento no hospital, 112 tinham diagnóstico de hérnia de disco lombar, foram submetidos à cirurgia de microdiscectomia por técnica aberta e incluídos no estudo. Destes, 67 (59,8%) eram homens. A idade dos pacientes na ocasião da cirurgia variou entre 19 e 65 anos, com média de 42,4 anos (desvio padrão [DP] de 11,0 anos). Observamos que 37 (33,0%) pacientes estavam afastados do trabalho devido à dor na coluna, por períodos entre menos de uma semana até dois anos.

No pré-operatório, o peso dos pacientes variava entre 55 e 128kg, com média de 83kg (DP=14,4kg) e média de IMC de 27,3kg/m² (DP=3,6kg/m²), variando entre 19,2 e 36,7kg/m², sendo 33 (29,5%) com peso adequado, 48 (42,9%) em sobrepeso e 31 (27,7%) obesos.

Todos os relatórios da análise anatomopatológica confirmaram a identificação do tecido da amostra discal como sendo de disco intervertebral, de natureza fibrocartilaginosa, e ausência de sinais morfológicos de malignidade. O resultado das culturas dos tecidos mostrou uma minoria (12,5%) com positividade para qualquer crescimento bacteriano. A maioria dos casos positivos foi entre os homens. A tabela 1 apresenta as características dos pacientes na amostra total e classificados como positivos ou negativos para infecção. As análises que seguem consideram como “positivos” os casos em que apenas o disco intervertebral continha bactérias mais os casos em que outros tecidos, como muscular e ligamentar, também estavam afetados, indicando possível caso de contaminação durante a coleta ou processamento de amostras neste estudo.

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta e positividade para cultura tecidual do disco intervertebral

Característica	Resultado das culturas		Total (n=112)	Valor-p
	Negativo (n=98; 87,5%)	Positivo + contaminação (n=14; 12,5%)		
Sexo				
Feminino	43 (43,9)	2 (14,3)	45 (40,2)	0,035Q
Masculino	55 (56,1)	12 (85,7)	67 (59,8)	
Idade na cirurgia (anos)				
Média (DP)	42,7 (10,8)	40,6 (12,4)	42,4 (11,0)	0,529M
Mediana (Q1; Q3)	40,0 (36,0; 50,0)	38,5 (33,0; 49,0)	40,0 (36,0; 50,0)	
Mínimo; máximo	20,0; 69,0	19,0; 60,0	19,0; 69,0	
Peso (kg)				
Média (DP)	82,5 (14,6)	86,6 (13,3)	83,0 (14,4)	0,328T
Mediana (Q1; Q3)	82,5 (72,0; 93,0)	85,5 (83,0; 90,0)	83,0 (73,0; 92,5)	
Mínimo; máximo	55,0; 128,0	59,0; 110,0	55,0; 128,0	
Altura (m)				
Média (DP)	1,73 (0,09)	1,78 (0,07)	1,74 (0,09)	0,068T
Mediana (Q1; Q3)	1,72 (1,67; 1,80)	1,80 (1,72; 1,86)	1,73 (1,67; 1,81)	
Mínimo; máximo	1,55; 1,97	1,68; 1,87	1,55; 1,97	
IMC (kg/m ²)				
Média (DP)	27,3 (3,7)	27,1 (3,1)	27,3 (3,6)	0,856T
Mediana (Q1; Q3)	27,4 (24,2; 30,2)	26,9 (24,9; 29,8)	27,3 (24,4; 30,1)	
Mínimo; máximo	19,2; 36,7	20,9; 31,5	19,2; 36,7	
Classificação do IMC				
Normal	29 (29,6)	4 (28,6)	33 (29,5)	0,881R
Sobrepeso	41 (41,8)	7 (50)	48 (42,9)	
Obesidade	28 (28,6)	3 (21,4)	31 (27,7)	

DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; IMC: índice de massa corpórea; M: teste não paramétrico de Mann-Whitney; T: teste t de Student para variâncias homogêneas; R: teste da razão de verossimilhanças; Q: teste de qui-quadrado. Classificação do IMC adotada: normal 18,5 a 24,9kg/m²; sobrepeso 25 a 29,9kg/m² e obesidade ≥ 30,0kg/m².

As comorbidades estão descritas na tabela 2: 12 (10,7%) pacientes eram hipertensos, três (2,7%) eram diabéticos, dois (1,8%) tinham artrite reumatoide e dois (1,8%) sofriam de doença coronariana. A maioria dos pacientes não era fumante: 12 (10,7%) eram ex-fumantes e 12 (10,7%) fumantes atuais; sete (6,3%) pacientes tinham consumo leve de bebidas alcoólicas e somente um (0,9%) tinha consumo moderado a alto.

Tratamento com infiltração de corticoide no período de seis meses antes da cirurgia foi feito por 24 (21,4%) pacientes e 43 (38,4%) utilizaram corticoides orais no período de três meses antes da cirurgia (Tabela 2).

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta

Características	Resultado das culturas		Total (n=112)	Valor-p
	Negativo (n=98; 87,5%)	Positivo + contaminação (n=14; 12,5%)		
Afastamento do trabalho				0,138F
Não	63 (64,3)	12 (85,7)	75 (67,0)	
Sim	35 (35,7)	2 (14,3)	37 (33,0)	
Hipertensão arterial				0,172F
Não	89 (90,8)	11 (78,6)	100 (89,3)	
Sim	9 (9,2)	3 (21,4)	12 (10,7)	
<i>Diabetes mellitus</i>				>0,99F
Não	95 (96,9)	14 (100,0)	109 (97,3)	
Sim	3 (3,1)	0 (0,0)	3 (2,7)	
Artrite reumatoide				>0,99F
Não	96 (98,0)	14 (100,0)	110 (98,2)	
Sim	2 (2,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	
Doença arterial coronariana				>0,99F
Não	96 (98,0)	14 (100,0)	110 (98,2)	
Sim	2 (2,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	
Tabagismo				0,248R
Nunca fumou	74 (75,5)	7 (50,0)	81 (72,3)	
Ex-fumante	8 (8,2)	4 (28,6)	12 (10,7)	
Fumante	10 (10,2)	2 (14,3)	12 (10,7)	
Não informado	6 (6,1)	1 (7,1)	7 (6,3)	
Consumo de álcool				>0,99R
Ausente ou esporádico (<1 copo/dia)	49 (50,0)	7 (50,0)	56 (50,0)	
Leve (1 a 2 copos/dia)	6 (6,1)	1 (7,1)	7 (6,3)	
Moderado a alto (3 ou mais copos/dia)	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	
Não informado	42 (42,9)	6 (42,9)	48 (42,9)	
Infiltração com corticoide até seis meses antes da cirurgia				>0,99F
Não	77 (78,6)	11 (78,6)	88 (78,6)	
Sim	21 (21,4)	3 (21,4)	24 (21,4)	
Número de infiltrações [#]				0,769R
Nenhuma	81 (82,7)	11 (78,6)	92 (82,1)	
Uma	15 (15,3)	3 (21,4)	18 (16,1)	
Duas	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	
Três	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	
Uso de corticoides orais até três meses antes da cirurgia				0,163Q
Não	58 (59,2)	11 (78,6)	69 (61,6)	
Sim	40 (40,8)	3 (21,4)	43 (38,4)	

[#]: o número de zero infiltração é superior ao número de pacientes que não realizaram infiltração; R: teste da razão de verossimilhanças; F: teste exato de Fisher; Q: teste de qui-quadrado.

Observamos que a maioria dos pacientes tinha hérnia de disco no nível L4-L5 e em L5-S1 (Tabela 3). O tempo cirúrgico variou entre 45 e 180 minutos, com mediana de 86 minutos. Durante a cirurgia, o tempo mediano para retirada do ligamento amarelo foi 20 minutos, para retirada do disco intervertebral foi 40 minutos e para retirada do músculo foi 65 minutos. O tempo cirúrgico total ou o tempo para ressecção de cada amostra não se relacionou significativamente com a positividade da cultura. O tempo de internação pós-cirúrgico variou entre menos de um dia até sete dias, com mediana de um dia (primeiro quartil um dia e terceiro quartil dois dias).

Tabela 3. Características cirúrgicas dos pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta

Características	Resultado das culturas		Total (n=112)	Valor-p
	Negativo (n=98; 87,5%)	Positivo + contaminação (n=14; 12,5%)		
Tempo cirúrgico (minutos)				
Média (DP)	92,3 (26,8)	90,5 (38,4)	92,1 (28,3)	0,309M
Mediana (Q1; Q3)	90,0 (72,0; 105,0)	80,0 (60,0; 95,0)	86,0 (70,0; 105,0)	
Mínimo; máximo	45,0; 180,0	49,0; 172,0	45,0; 180,0	
Tempo para retirada do ligamento amarelo				
Média (DP)	24,0 (10,6)	27,0 (13,9)	24,3 (11,1)	0,405M
Mediana (Q1; Q3)	20,0 (15,0; 30,0)	22,0 (20,0; 25,0)	20,0 (15,5; 30,0)	
Mínimo; máximo	10,0; 60,0	12,0; 62,0	10,0; 62,0	
Tempo para retirada do disco intervertebral				
Média (DP)	44,1 (17,7)	45,1 (25,1)	44,2 (18,6)	0,390M
Mediana (Q1; Q3)	40,0 (32,0; 50,0)	33,0 (30,0; 44,0)	40,0 (30,0; 50,0)	
Mínimo; máximo	17,0; 90,0	24,0; 95,0	17,0; 95,0	
Tempo para retirada do músculo				
Média (DP)	70,2 (24,1)	68,4 (36,9)	70,0 (25,9)	0,281M
Mediana (Q1; Q3)	65,0 (50,0; 85,0)	55,0 (42,0; 66,0)	65,0 (50,0; 84,5)	
Mínimo; máximo	28,0; 140,0	33,0; 143,0	28,0; 143,0	
Nível da hérnia				
L2-L3	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	0,812R
L3-L4	4 (4,1)	0 (0,0)	4 (3,6)	
L4-L5	51 (52,0)	8 (57,1)	59 (52,7)	
L5-S1	42 (42,9)	6 (42,9)	48 (42,9)	
Tempo de internação (dias)				
Média (DP)	1,5 (1,0)	1,4 (1,2)	1,5 (1,0)	0,527M
Mediana (Q1; Q3)	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	
Mínimo; máximo	1,0; 7,0	0,0; 5,0	0,0; 7,0	

DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil, M: teste não paramétrico de Mann-Whitney; R: teste da razão de verossimilhanças.

3.2 Microrganismos identificados

Observamos dois (1,8%; IC95%: 0,3 a 6,9%) pacientes com infecção no disco, ou seja, com cultura do disco positiva e culturas do ligamento amarelo e músculo multifídeo negativas. Observamos três (2,7%) pacientes com cultura positiva no ligamento, sete (6,3%) no disco e 12 (10,7%) pacientes com cultura positiva no músculo. Foram isolados patógenos aeróbios e anaeróbios e nenhum fungo. Assim, identificamos 12 (10,7%) pacientes como casos de contaminação intraoperatória e 98 (87,5%) com resultados negativos. Os patógenos isolados estão listados na tabela 4.

Tabela 4. Resultados da pesquisa de microrganismos em pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta

Resultado das análises por tecido	n (%)
Ligamento amarelo	
Cultura positiva	
Aeróbia	2 (1,8)
Anaeróbia	1 (0,9)
Patógenos isolados	
<i>Cutibacterium acnes</i>	1 (0,9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0,9)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1 (0,9)
Disco intervertebral herniado	
Cultura positiva	
Aeróbia	3 (2,7)
Anaeróbia	4 (3,6)
Patógenos isolados	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (0,9)
<i>Cutibacterium acnes</i>	3 (2,7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (2,7)
Músculo multifídeo	
Cultura positiva	
Aeróbia	9 (8,0)
Anaeróbia	5 (4,5)
Patógenos isolados	
<i>Cutibacterium acnes</i>	5 (4,5)
<i>Cutibacterium acnes/Staphylococcus aureus</i>	1 (0,9)
<i>Cutibacterium acnes/Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (0,9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (2,7)
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1 (0,9)
<i>Staphylococcus warneri</i>	1 (0,9)
Resultado da pesquisa de microrganismos	
Infecção	2 (1,8)
Contaminação	12 (10,7)
Negativo	98 (87,5)

n=112.

Os dois casos de infecção do disco eram homens, com 33 e 49 anos, um com 86kg, 1,75m e IMC de 28,08kg/m² e outro com 90kg, 1,84m e IMC de 26,58kg/m², ambos sem afastamento do trabalho. Um deles era hipertenso, não diabético, sem artrite reumatoide ou doença arterial coronariana, um ex-fumante, um fez uma infiltração, ambos utilizaram corticoides orais. Um paciente teve tempo cirúrgico de 172 minutos, 62 minutos até a retirada do ligamento amarelo, 95 minutos para o disco intervertebral e 143 minutos para o músculo, nível operado L5-S1 e um dia de internação sem complicações. Neste paciente, foi isolado no disco o *Staphylococcus aureus*. Para o outro paciente, foram 57 minutos de cirurgia, 12 minutos para retirada do ligamento amarelo, 24 minutos para o disco intervertebral e 40 minutos para o músculo, nível da hérnia em L4-L5 e dois dias de internação, também sem complicações. Neste paciente, foi isolado no disco o *Cutibacterium acnes*. Observamos que um desses pacientes não tinha Modic no pré-operatório e assim se manteve no pós-operatório e o outro tinha Modic I e II no pré-operatório no mesmo planalto vertebral e assim se manteve no pós-operatório.

Não foi possível investigar as relações entre fatores de prognóstico clínico dos pacientes e o diagnóstico de infecção por termos apenas dois pacientes com presença de infecção. Com isso, as comparações foram realizadas entre os grupos “Negativo” (ou seja, todas as amostras negativas) e “Contaminação + Positivos” (positivos em duas de três culturas para cada amostra), o que somou 14 pacientes.

3.3 Avaliação das alterações de Modic nas imagens de ressonância magnética

A avaliação das alterações de Modic mostram que não há evidências de diferenças entre os grupos Negativo e Positivo + Contaminação tanto para Modic tipo I, quanto para Modic tipo II e para a soma, independentemente do período, pré ou pós-operatório. As comparações dentro dos grupos entre momentos mostram redução significativa nos valores de área, independentemente do grupo e para o total, tanto para alterações de Modic tipo I quanto para a soma da área da alteração de Modic, independentemente do tipo (Tabela 5).

Tabela 5. Comparações relativas a área de alteração de Modic em milímetros quadrados (mm²) entre pacientes com diagnóstico de hérnia de disco lombar submetidos à cirurgia de hérnia de disco por técnica aberta

Alteração e momento de avaliação: pré ou pós-cirurgia	Resultado das culturas		Total (n=112)	Valor-p
	Negativo (n=98; 87,5%)	Positivo + contaminação (n=14; 12,5%)		
Modic I área pré				0,148M
Média (DP)	132,7 (189,7)	168,9 (162,7)	137,2 (186,2)	
Mediana (Q1; Q3)	45,8 (0,0; 189,0)	154,1 (103,5; 192,5)	64,9 (0,0; 190,8)	
Mínimo; máximo	0,0; 794,1	0,0; 663,6	0,0; 794,1	
Modic I área pós				0,261M
Média (DP)	77,9 (155,7)	106,6 (134,0)	81,5 (152,9)	
Mediana (Q1; Q3)	0,0 (0,0; 55,4)	58,8 (0,0; 140,9)	0,0 (0,0; 101,6)	
Mínimo; máximo	0,0; 714,4	0,0; 384,7	0,0; 714,4	
Valor-p (Pré x pós-Modic I)	<0,001W	0,041W	<0,001W	
Modic II área pré				0,654M
Média (DP)	64,7 (123,1)	73,1 (195,5)	65,7 (133,2)	
Mediana (Q1; Q3)	0,0 (0,0; 73,9)	0,0 (0,0; 20,9)	0,0 (0,0; 68,7)	
Mínimo; máximo	0,0; 626,7	0,0; 730,0	0,0; 730,0	
Modic II área pós				0,991M
Média (DP)	56,7 (129,6)	46,4 (126,8)	55,4 (128,7)	
Mediana (Q1; Q3)	0,0 (0,0; 17,3)	0,0 (0,0; 14,0)	0,0 (0,0; 15,7)	
Mínimo; máximo	0,0; 671,9	0,0; 475,6	0,0; 671,9	
Valor-p (Pré x pós-Modic II)	0,122W	0,080W	0,052W	
Modic área pré				0,239M
Média (DP)	197,3 (285,2)	242,0 (346,6)	202,9 (292,2)	
Mediana (Q1; Q3)	72,4 (0,0; 305,6)	165,8 (103,5; 238,3)	93,6 (0,0; 278,9)	
Mínimo; máximo	0,0; 1103,4	0,0; 1393,6	0,0; 1393,6	
Modic área pós				0,465M
Média (DP)	134,6 (259,0)	153,0 (238,2)	136,9 (255,6)	
Mediana (Q1; Q3)	0,0 (0,0; 151,7)	68,1 (0,0; 181,1)	0,0 (0,0; 156,4)	
Mínimo; máximo	0,0; 1386,3	0,0; 860,4	0,0; 1386,3	
Valor-p (Pré x pós-Modic)	<0,001W	0,041W	<0,001W	

DP: desvio padrão; M: teste não paramétrico de Mann-Whitney; W: teste de Wilcoxon para dados pareados; área em mm².

3.4 Medidas avaliadas ao longo do tempo

Os pacientes foram acompanhados até 12 meses após a realização da cirurgia (Tabela 6).

Não houve evidência de diferenças na VHS entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados e nem de alteração nas medidas ao longo do tempo. Nos dois grupos, de positivos e negativos, observamos um decréscimo dos valores da

proteína C-reativa do pré-operatório para um mês, porém o valor voltou a aumentar após seis meses. Não houve evidência de diferenças entre os grupos.

Não houve evidência de diferenças nos níveis de leucócitos no hemograma entre os grupos. No entanto, houve evidência de redução significativa nos valores do pré-operatório para um mês e seis meses após a cirurgia, sendo que, no Grupo Negativo, esta redução também foi significativa após 12 meses quando comparada ao pré-operatório.

Não houve evidência de diferenças entre os dois grupos para a dor no membro inferior, analisada pela NRS. Porém, houve redução importante da dor após a cirurgia, em todos os momentos pós-cirúrgicos, nos dois grupos estudados. O mesmo foi observado para o NRS de dor lombar.

A análise do ODI mostrou que houve redução importante da disfunção para todos os momentos pós-cirúrgicos, nos dois grupos estudados, sendo que o grupo negativo para infecção apresentava escore significativo maior no pré-operatório.

Observamos um aumento significativo nos escores de qualidade de vida (medidos pelo EQ-5D) após a cirurgia. O aumento se manteve significativo até 12 meses para os dois grupos.

Tabela 6. Características observadas ao longo do tempo

Variável e momento de avaliação: pré ou pós-operatório	Negativo (n=98; 87,5%)		Positivo + contaminação (n=14; 12,5%)		Valor-p positivo x negativo
	Média (IC 95%)	Valor-p em relação ao pré	Média (IC 95%)	Valor-p em relação ao pré	
VHS					
Pré-	14,6 (12,4; 17,2)	Ref.	12,9 (8,8; 18,9)	Ref.	0,541
1 mês	14,4 (12,6; 16,5)	>0,99	12,3 (9,4; 16,1)	0,855	0,285
6 meses	16,6 (14,7; 18,7)	0,477	14,4 (11,2; 18,5)	0,855	0,300
12 meses	14,1 (11,9; 16,6)	>0,99	15,2 (10,8; 21,5)	0,769	0,696
Proteína C-reativa					
Pré	5,2 (3,1; 8,7)	Ref.	2,7 (1,8; 4,2)	Ref.	0,101
1 mês	1,3 (1,0; 1,6)	0,011	1,2 (0,6; 2,2)	0,043	0,851
6 meses	2,4 (2,0; 2,8)	0,062	2,4 (1,1; 5,4)	>0,99	0,955
12 meses	2,2 (1,6; 2,9)	0,062	2,8 (1,4; 5,7)	>0,99	0,566
Leucócitos					
Pré	8245 (7668; 8865)	Ref.	8268 (7409; 9227)	Ref.	0,967
1 mês	7412 (6925; 7933)	0,016	7109 (6064; 8333)	0,009	0,631
6 meses	6665 (6407; 6933)	<0,001	6881 (6177; 7665)	0,026	0,590
12 meses	6652 (6311; 7012)	<0,001	6849 (5871; 7989)	0,059	0,729
NRS MI					

continua...

...continuação					
Pré	7,1 (6,6; 7,7)	Ref.	6,1 (4,8; 7,6)	Ref.	0,171
1 mês	2,1 (1,7; 2,6)	<0,001	2,5 (1,3; 4,9)	<0,001	0,623
3 meses	1,9 (1,5; 2,4)	<0,001	1,4 (0,5; 3,7)	<0,001	0,496
6 meses	1,5 (1,1; 2,0)	<0,001	0,8 (0,3; 1,7)	<0,001	0,051
12 meses	1,3 (0,9; 1,8)	<0,001	1,2 (0,5; 3,1)	<0,001	0,886
NRS lombar					
Pré	5,7 (5,1; 6,4)	Ref.	6,6 (5,6; 7,8)	Ref.	0,176
1 mês	1,9 (1,5; 2,4)	<0,001	2,5 (1,5; 4,3)	<0,001	0,394
3 meses	1,9 (1,5; 2,4)	<0,001	1,7 (0,8; 3,3)	<0,001	0,700
6 meses	1,8 (1,4; 2,4)	<0,001	1,8 (0,8; 4,2)	<0,001	0,995
12 meses	1,5 (1,1; 1,9)	<0,001	2,1 (1,1; 4,0)	<0,001	0,403
ODI					
Pré	49,2 (45,4; 53,3)	Ref.	33,4 (26,0; 43,1)	Ref.	0,001
1 mês	18,5 (15,7; 21,8)	<0,001	20,6 (14,1; 29,9)	0,009	0,622
3 meses	14,2 (11,6; 17,3)	<0,001	13,1 (9,6; 17,9)	<0,001	0,684
6 meses	12,3 (9,7; 15,5)	<0,001	8,4 (5,5; 12,8)	<0,001	0,093
12 meses	10,5 (8,2; 13,3)	<0,001	9,4 (5,6; 15,9)	<0,001	0,715
EQ-5D					
Pré	0,3 (0,2; 0,4)	Ref.	0,4 (0,2; 0,6)	Ref.	0,145
1 mês	0,7 (0,7; 0,8)	<0,001	0,8 (0,7; 0,8)	0,002	0,672
3 meses	0,8 (0,7; 0,8)	<0,001	0,8 (0,8; 0,9)	<0,001	0,295
6 meses	0,8 (0,7; 0,8)	<0,001	0,9 (0,9; 1,0)	<0,001	<0,001
12 meses	0,8 (0,8; 0,9)	<0,001	0,8 (0,7; 0,9)	<0,001	0,882

VHS: velocidade de hemossedimentação; NRS: escala numérica de dor; MI: membro inferior, ODI: *Oswestry Disability Scale*; EQ-5D: Euro-QOL5.

3.5 Microbioma do disco degenerado (sequenciamento de nova geração)

O teste de NGS foi aplicado nos últimos 17 pacientes incluídos no estudo, tendo sido 12 do sexo masculino. A média de idade desses pacientes foi de 42,8 anos (31 a 59 anos). Entre esses pacientes, nenhum deles realizou qualquer tipo de infiltração prévia na coluna.

Todos os últimos 17 pacientes submetidos ao NGS apresentaram cultura do disco com resultado negativo, assim como cultura negativa do músculo e do ligamento amarelo. Dessa maneira, nenhum desses pacientes foi considerado como infecção ou contaminação intraoperatória. Ao longo de um ano, nenhum desses pacientes apresentou infecção na coluna relacionada com a cirurgia ou alteração significativa dos exames laboratoriais, ou seja, não houve caso de definição de infecção pós-operatória, com dor, febre, alteração significativa de exames laboratoriais ou confirmada por ressonância magnética, independente de novas culturas de tecidos.

Foi detectada uma pequena quantidade de sequências mapeadas dentro do universo de milhões de leituras de sequências de DNA bacteriano. O sequenciamento mapeou uma média de 14.645 (6.540 a 27.176) sequências de DNA bacteriano para cada amostra de disco de cada paciente.

Houve um total de 45 gêneros diferentes de bactéria identificados, com quantidades diferentes de DNA detectadas com confiabilidade de mapeamento maior que 70%. Os remanescentes (ou fragmentos do DNA bacteriano) dos patógenos detectados e o número de sequências mapeadas estão demonstrados na tabela 7. Houve média de oito (3 a 17) elementos de bactérias diferentes em cada amostra do disco intervertebral.

Levando em consideração um número mínimo arbitrário e consensual entre os pesquisadores de 20 sequências lidas para cada bactéria como casos de colonização, houve nove pacientes com quantidade considerável de sequências mapeadas para pelo menos uma bactéria (Tabela 7, em negrito). As três bactérias com elementos mais frequentemente detectadas foram *Ralstonia*, *Burkholderia* e *Lactobacillus*. Os pacientes numerados como seis e 16 apresentaram número de sequências considerável de *Lactobacillus*; 100 e 429 respectivamente. Após o *Lactobacillus*, o *Streptococcus*, com 163 sequências no paciente 16, e o *Aerococcus*, com 45 sequências no paciente um, foram os mais frequentemente identificados, com maior quantidade de leituras mapeadas.

Tabela 7. Distribuição das amostras sequenciadas e da porcentagem do total das sequências mapeadas, número de bactérias mapeadas, gênero identificado e número de sequências para cada bactéria

Paciente	Total de sequências mapeadas	Sequências bacterianas mapeadas	Gênero bacteriano mapeado (confiabilidade >70%)	Número de sequências para cada gênero	%
1	55.576	7.374	<i>Aerococcus</i>	45	0,61
			<i>Lactobacillus</i>	26	0,35
			<i>Alkalibacterium</i>	22	0,30
			<i>Staphylococcus</i>	13	0,18
			<i>Herbaspirillum</i>	11	0,15
			<i>Ralstonia</i>	10	0,14
			<i>Burkholderia</i>	6	0,08
			<i>Roseateles</i>	6	0,08
			<i>Alcanivorax</i>	6	0,08
			<i>Halomonas</i>	5	0,07
			<i>Bosea</i>	4	0,05

continua....

...continuação

			<i>Acetobacter</i>	4	0,05
			<i>Bradyrhizobium</i>	2	0,03
			<i>Gemmobacter</i>	1	0,01
			<i>Novosphingobium</i>	1	0,01
			Burkolderia	39	0,34
			Ralstonia	25	0,22
			Herbaspirillum	21	0,18
			<i>Diaphorobacter</i>	4	0,04
			<i>Acetobacter</i>	3	0,03
			<i>Reyranella</i>	3	0,03
2	56.224	11.397	<i>Rhodopila</i>	2	0,02
			<i>Rhizomicrobium</i>	2	0,02
			<i>Aerococcus</i>	1	0,01
			<i>Lactobacillus</i>	1	0,01
			<i>Bacillus</i>	1	0,01
			<i>Staphylococcus</i>	1	0,01
			<i>Listeria</i>	1	0,01
			Burkolderia	20	0,18
3	46.572	10.838	Ralstonia	20	0,18
			<i>Herbaspirillum</i>	12	0,11
			<i>Roseateles</i>	2	0,02
			<i>Aerococcus</i>	13	0,20
			<i>Lactobacillus</i>	10	0,15
			<i>Alcanivorax</i>	10	0,15
			<i>Halomonas</i>	6	0,09
4	43.944	6.540	<i>Acetobacter</i>	6	0,09
			<i>Ralstonia</i>	5	0,08
			<i>Burkolderia</i>	3	0,05
			<i>Herbaspirillum</i>	3	0,05
			<i>Roseateles</i>	1	0,02
			<i>Diaphorobacter</i>	1	0,02
			<i>Ralstonia</i>	7	0,05
5	80.39	14.965	<i>Burkolderia</i>	4	0,03
			<i>Herbaspirillum</i>	4	0,03
			Lactobacillus	100	0,48
			<i>Streptococcus</i>	9	0,04
			<i>Pseudomonas</i>	5	0,02
			<i>Acinetobacter</i>	3	0,01
			<i>Enhydrobacter</i>	3	0,01
6	103.878	21.000	<i>Burkolderia</i>	3	0,01
			<i>Ralstonia</i>	2	0,01
			<i>Herbaspirillum</i>	2	0,01
			<i>Diaphobacter</i>	2	0,01
			<i>Schlegelella</i>	2	0,01
			<i>Comamonas</i>	1	0,00

continua...

...continuação

			<i>Gluconobacter</i>	1	0,00
			<i>Acetobacter</i>	1	0,00
			<i>Haematobacter</i>	1	0,01
			Burkolderia	37	0,14
7	135.744	27.176	Ralstonia	27	0,10
			<i>Herbaspirillum</i>	18	0,07
			<i>Roseateles</i>	2	0,01
			<i>Burkolderia</i>	3	0,02
8	87.588	16.929	<i>Herbaspirillum</i>	3	0,02
			<i>Ralstonia</i>	1	0,01
			<i>Escherichia/Shigella</i>	1	0,01
			<i>Herbaspirillum</i>	13	0,07
9	118.534	17.443	<i>Burkolderia</i>	10	0,06
			<i>Ralstonia</i>	4	0,02
			<i>Roseateles</i>	4	0,02
			<i>Pedomicrobium</i>	1	0,01
			<i>Burkolderia</i>	7	0,08
10	55.942	9.174	<i>Ralstonia</i>	4	0,04
			<i>Herbaspirillum</i>	4	0,04
			<i>Diaphorobacter</i>	3	0,03
			<i>Ralstonia</i>	7	0,04
			<i>Burkolderia</i>	5	0,03
			<i>Herbaspirillum</i>	4	0,02
11	75.494	18.416	<i>Roseateles</i>	1	0,01
			<i>Actobacter</i>	1	0,01
			<i>Sphingobium</i>	1	0,01
			<i>Escherichia/Shigella</i>	1	0,01
			Ralstonia	26	0,21
			<i>Roseateles</i>	12	0,10
			<i>Burkolderia</i>	10	0,08
12	55.21	12.381	<i>Herbaspirillum</i>	8	0,06
			<i>Undibacterium</i>	8	0,06
			<i>Pelomonas</i>	3	0,02
			<i>Bradythizobium</i>	2	0,02
			<i>Lactobacillus</i>	2	0,02
			<i>Diaphorobacter</i>	15	0,15
			<i>Herbaspirillum</i>	5	0,05
			<i>Comamonas</i>	5	0,05
13	45.26	9.791	<i>Burkolderia</i>	4	0,04
			<i>Ralstonia</i>	4	0,04
			<i>Pelomonas</i>	2	0,02
			<i>Brevundimonas</i>	2	0,02
			<i>Acetobacter</i>	1	0,01
14	75.812	17.737	Ralstonia	28	0,16
			<i>Burkolderia</i>	19	0,11
			<i>Herbaspirillum</i>	19	0,11
			<i>Roseateles</i>	12	0,07

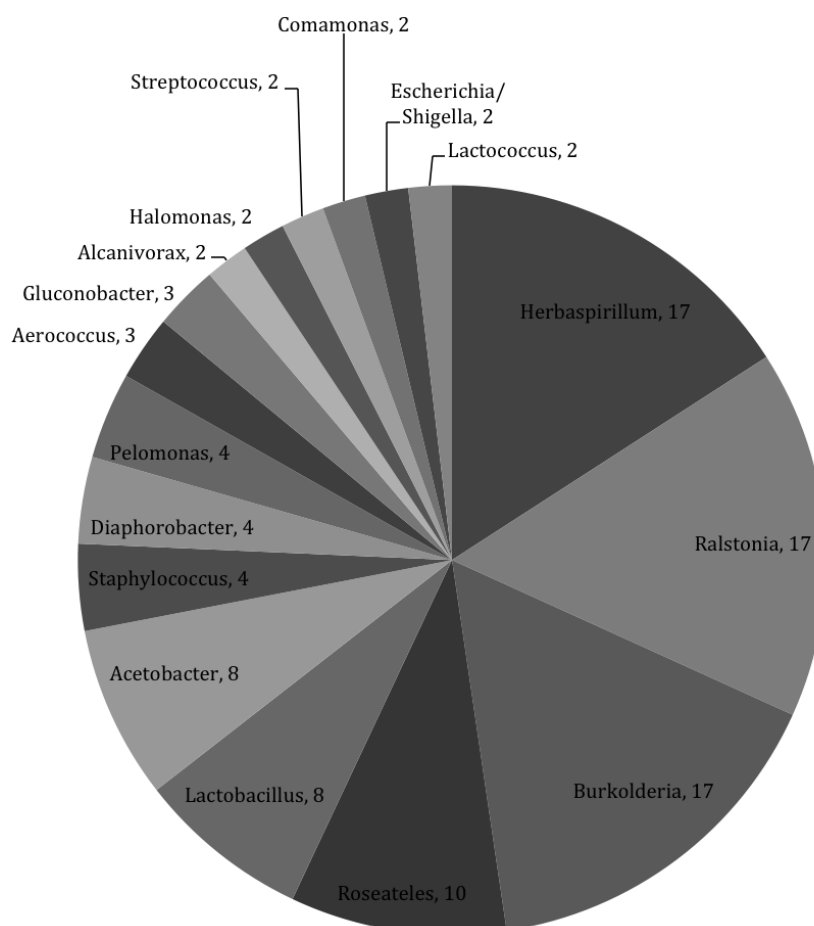
continua...

...continuação

			<i>Acetobacter</i>	10	0,06
			<i>Lactobacillus</i>	3	0,02
			<i>Lactococcus</i>	1	0,01
15	67.572	15.907	<i>Acetobacter</i>	21	0,13
			<i>Gluconobacter</i>	17	0,11
			<i>Herbaspirillum</i>	17	0,11
			<i>Burkolderia</i>	9	0,06
			<i>Ralstonia</i>	5	0,03
			<i>Pelomonas</i>	2	0,01
			<i>Roseateles</i>	1	0,01
			<i>Lactobacillus</i>	1	0,01
			<i>Lactobacillus</i>	429	2,31
			<i>Streptococcus</i>	163	0,88
			<i>Lactococcus</i>	39	0,21
16	102.742	18.580	<i>Staphylococcus</i>	38	0,20
			<i>Leuconostoc</i>	38	0,20
			<i>Anoxybacillus</i>	27	0,15
			<i>Acetobacter</i>	17	0,09
			<i>Gluconobacter</i>	16	0,09
			<i>Gluconacetobacter</i>	14	0,08
			<i>Roseomonas</i>	11	0,06
			<i>Herbaspirillum</i>	9	0,05
			<i>Ralstonia</i>	8	0,04
			<i>Burkolderia</i>	7	0,04
			<i>Duganella</i>	4	0,02
17	67.348	13.309	<i>Pelomonas</i>	3	0,02
			<i>Chryseobacterium</i>	2	0,01
			<i>Cloacibacterium</i>	1	0,01
			<i>Herbaspirillum</i>	6	0,05
			<i>Roseateles</i>	3	0,02
			<i>Burkolderia</i>	3	0,02
			<i>Ralstonia</i>	2	0,02
			<i>Staphylococcus</i>	2	0,02

Bactérias com mais de 20 leituras estão em negrito.

Três sequências bacterianas estiveram presentes em todas as amostras de disco, sendo elas: *Herbaspirillum*, *Ralstonia* e *Burkolderia*, seguidas em frequência pela *Roseateles* (dez amostras) e *Lactobacillus* e *Acetobacter* (oito amostras cada). A frequência da presença de cada elemento bacteriano em cada amostra de disco está representada na figura 5. Embora tenha havido um número médio considerável de espécies bacterianas mapeados em cada amostra de disco, a quantidade de leituras de sequências relacionadas a cada espécie foi baixa considerando o número total de sequências mapeadas.



Apenas bactérias detectadas em mais do que duas amostras estão representadas.

Figura 5. Remanescentes bacterianos mais frequentes e o número de amostras de disco com pelo menos uma sequência desse patógeno

O paciente 16 apresentou a amostra de disco com o microbioma mais diversificado de todas as amostras coletadas para esse exame. A classificação taxonômica dos achados deste paciente específico está representada na figura 6.

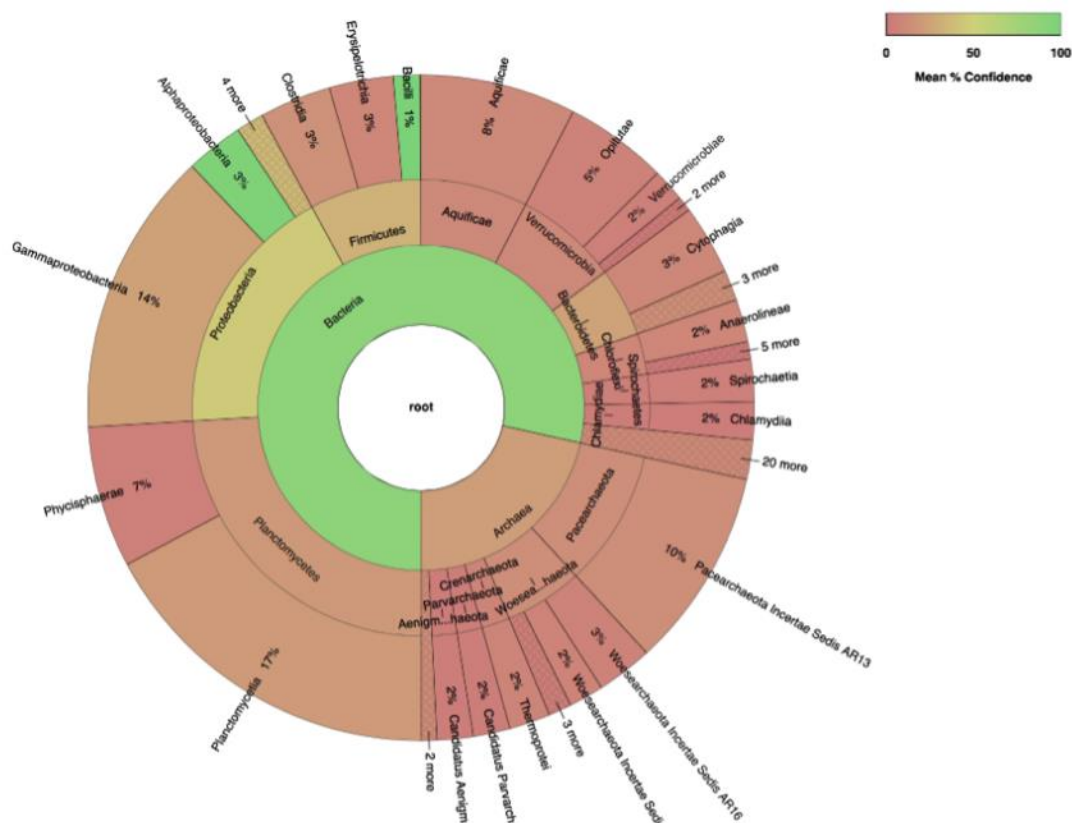


Figura 6. Classificação taxonômica dos patógenos encontrados na análise de microbioma da amostra do paciente com maior diversidade de bactérias encontrado (número 16)

Apesar de ter sido o patógeno focado neste estudo, o *Cutibacterium acnes* não foi identificado em nenhuma análise de microbioma de disco.

4 DISCUSSÃO

4.1 Baixa prevalência de infecção do disco herniado

Avaliamos neste estudo uma coorte de pacientes com hérnia de disco lombar sofrendo com dor lombar irradiada para a perna, resistente a tratamento conservador, que levou à indicação de tratamento cirúrgico de microdiscectomia. Estávamos à procura de uma explicação microbiológica para a condição, com a hipótese de que o quadro degenerativo discal pudesse se explicar por uma prevalência elevada de infecção do disco — em especial a presença ou colonização do *Cutibacterium acnes* no disco intervertebral degenerado —, ainda que de baixa virulência e de baixo grau de atividade inflamatória, ou mesmo que essa positividade do disco pudesse ser correlacionada com as alterações de imagem presentes nos estudos de ressonância magnética da coluna lombar mais tarde. No entanto, o grupo avaliado neste estudo não expressou, na grande maioria, qualquer positividade para a cultura dos tecidos investigados: mais de 88% eram totalmente negativos para todos os tecidos, e somente dois pacientes (1,8%) tinham positividade somente no disco (indicando infecção e não contaminação intraoperatória). Apesar de ter sido o patógeno focado neste estudo, o *C. acnes* cresceu em três culturas de disco intervertebral, somente uma considerada como infecção, e não foi identificado em nenhuma análise de microbioma de disco, que é o método mais sensível para essa análise.

O disco intervertebral por muito tempo foi considerado um ambiente estéril,^(49,76,77) até pelas suas características moleculares e de pH hostis para qualquer patógeno, e as causas da sua degeneração foram relacionadas com alterações biomecânicas da unidade motora ou desequilíbrios celulares e da matriz extracelular. No entanto, o disco intervertebral com hérnia de disco em geral passa previamente por processo de degeneração, e a estrutura arquitetônica do anel fibroso e do núcleo pulposos se perde, de maneira que as barreiras entre uma zona e outra não são claramente distintas. Como uma história natural, é esperado que, com o tempo, as modificações do equilíbrio molecular e mecânico em algum momento possam levar ao desgaste progressivo do arcabouço estrutural do disco intervertebral. Em hérnias extrusas, principalmente, há uma ruptura do ânulo fibroso, ou seja, da barreira que separa o meio interno discal do meio externo, que no caso é o canal vertebral. Dessa maneira, pode-se

hipotetizar que essa seja uma porta de entrada para bactérias que invadem o interior discal e o colonizam. Considerando que as vias hematogênicas são escassas no disco intervertebral, a ideia de que uma porta de entrada criada por alterações estruturais biomecânicas possibilite a perpetuação de bactérias dentro do disco é relevante e digna de investigação.

Muitas vezes, a falta de correlação entre as alterações estruturais da unidade funcional disco-vértebra e sintomas clínicos de dor lombar põe em questão a etiologia do processo inflamatório que realmente leva a lombalgia. Alterações de exames de imagens como na ressonância magnética da coluna lombar com característica degenerativa são muito prevalentes em pacientes assintomáticos, e essa taxa aumenta de acordo com o avançar da idade.⁽⁷⁸⁾ A relação entre presença de alterações degenerativas na coluna lombar apontadas nos exames de imagem com alterações clínicas como a dor lombar não é precisa, e é até fraca.⁽⁷⁹⁾ A razão pela qual alguns pacientes com alterações nos exames de imagem têm dor lombar e outros são assintomáticos, ou mesmo alguns melhoram com tratamentos simples e curtos e outros desenvolvem lombalgia crônica, é alvo de questionamento sobre possíveis diferentes etiologias do processo inflamatório e gênese da dor. A relação entre alterações inflamatórias da unidade funcional que levam à DLC e um possível patógeno causador desse processo foi alvo de investigação no nosso estudo: a hipótese que motivou este estudo era a de que existiriam bactérias colonizando o disco intervertebral, que poderiam estar relacionadas também com o processo de degeneração do disco intervertebral.

A presença de DLC poderia estar associada a uma infecção “subclínica”, uma infecção de baixa virulência, provocando baixo grau de atividade inflamatória (infecção por uma bactéria indolente de desenvolvimento lento que não leva a alterações clínicas típicas de uma infecção, como febre, mal-estar, alterações laboratoriais, mas a um quadro de dor leve/moderada e persistente). No entanto, a hipótese de colonização do disco, seja por infecção natural seja por contaminação durante a cirurgia, não foi confirmada neste estudo. Não seria possível testar se a prevalência de infecção do disco seria a mesma em pacientes “controle”, sem sintomas de dor lombar ou ciática — não seria ético submetê-los à biópsia para coleta do tecido para análise. Porém, a baixíssima taxa de infecção e baixa taxa de contaminação contribuem para confirmar que a associação é provavelmente nula. Seria então a dor lombar resultado somente de um processo de envelhecimento natural?

Uma cascata de eventos degenerativos pode ser observada na população jovem, adulta e idosa, com abaulamentos, protusões e extrusões discais.⁽⁸⁰⁾ Apesar de compreendermos melhor a estrutura molecular do disco e suas alterações no processo de envelhecimento e degeneração, a infecção ainda tem sido investigada como um possível iniciador da doença discal. Nosso estudo, no entanto, refuta a hipótese de que a degeneração discal tradicional teria causa infecciosa. As causas para degeneração discal humana ainda não estão claras.

Apesar de as discites infecciosas serem destrutivas do tecido do disco, a história natural da degeneração discal envolve o tempo e a idade do paciente, associados à carga genética, morfologia e distribuição de carga na coluna (biomecânica) e fatores externos (tabagismo, atividades físicas, movimentos repetitivos, sobrepeso). Estes seriam ainda os principais causadores da cascata degenerativa do disco intervertebral, ainda que na presença de alterações tipo Modic. No entanto, uma vez que se consideram todos os estudos apontando para a causa infecciosa, refutar esta hipótese com segurança exigiria máximo cuidado metodológico, abordando as falhas observadas em trabalhos prévios, com controles adequados onde possível para diferenciar infecção de uma contaminação ocorrendo no momento da cirurgia ou coleta de amostras.

Estudos prévios reportando culturas positivas de amostras de disco coletadas de cirurgias de coluna são geralmente criticados pela metodologia falha e possível contaminação de amostras, especialmente o *C. acnes*. Este agente é parte da microbiota da pele que coloniza a epiderme e muitos autores questionaram o isolamento desta bactéria em amostras de disco e o risco potencial de contaminação durante o procedimento.^(44,45,50,81,82) Consequentemente, o interesse no tópico aumentou e novos protocolos foram desenvolvidos para responder à questão se haveria ou não uma colonização bacteriana no disco. Nosso protocolo para coletar a amostra de disco, músculo e ligamento durante as cirurgias de coluna⁽⁵⁵⁾ levou a taxa muito baixa de culturas positivas, em especial no disco. Apesar de que alguns resultados pudessem ser interpretados como falso negativo, nenhum paciente apresentou sinais de infecção do disco em um ano de seguimento além de nenhuma alteração significativa dos marcadores laboratoriais. A suposta falta de sensibilidade da cultura do disco para bactérias fastidiosas foi colocada em prova na amostra de disco de 17 pacientes que foram submetidas à análise pelo NGS.⁽⁶³⁾

4.2 Cuidados metodológicos em investigação aprofundada

As principais críticas aos estudos anteriores que apresentaram taxa considerável de positividade de culturas de disco para *C. acnes* são embasadas na possível contaminação de amostra seja no processo de colheita até o preparo para cultura. A possibilidade de haver contaminação do disco já havia sido levantada por outros autores.^(49,76,77) Por isso mesmo, utilizamos cuidados específicos para evitar uma possível contaminação, a começar pela investigação de controles e outros tecidos como músculo e ligamento. Coleta de amostra de pele para eventual controle positivo não foi considerada para este estudo porque exigiria a retirada de amostra adicional de pele das costas para biópsia^(83,84) (que poderia detectar a presença do *C. acnes* e outras bactérias em folículo piloso), aumentando a invasão (incisão adicional com potencial cicatriz, dano não previsto na cirurgia de coluna). O *swab* da pele, que poderia ser considerado, não pareceu um substituto adequado para a biópsia de pele, considerando que *C. acnes* está presente nas camadas mais profundas da derme. E, de fato, a taxa de “casos positivos” foi baixa neste estudo mesmo considerando uma possível contaminação durante a cirurgia utilizando-se os controles de ligamento e músculo. Apesar de nos apoiarmos em estudos publicados na literatura que mostram positividade de culturas de disco intervertebral para *C. acnes* que chegam até 53%,⁽⁴³⁾ no nosso estudo, apenas 1% das amostras dos 112 pacientes apresentaram resultado positivo para *C. acnes*, considerado como um patógeno com origem no disco intervertebral, ou seja, sem sinais de contaminação no processo de isolamento do agente. O desenvolvimento de um protocolo multidisciplinar entre a equipe cirúrgica, equipe de laboratório, infectologistas e microbiologistas foi fundamental para minimizar ao máximo possíveis fontes de contaminação de amostra durante o processo, desde a sua retirada até o isolamento da peça na cultura. O tempo para cada procedimento cirúrgico também não se associou significativamente com a positividade — portanto também foi excluída a possibilidade de contaminação durante a cirurgia.

Por outro lado, para diminuir o risco de falsos negativos nas amostras de tecido que são enviadas para cultura, realizamos, de maneira pioneira, a análise de microbioma bacteriano do disco intervertebral por meio do exame de NGS. O processo de validação do NGS para um tecido com mínima quantidade de bactérias foi realizado pela equipe de microbiologia e o refinamento da técnica para este fim foi publicado

previamente por nós.^(55,63) Esta análise foi também realizada por Rajasekaran et al., em trabalho publicado durante a condução do nosso estudo, em 2020.⁽⁸⁵⁾ Os autores inicialmente detectaram proteínas bacterianas específicas no disco.⁽⁸⁶⁾ Posteriormente, eles aprofundaram a investigação da existência de microbioma no disco intervertebral em três tipos de tecido discal (disco normal, herniado e degenerado) usando NGS. As amostras foram coletadas de doadores de órgãos com morte encefálica. Os autores documentaram um microbioma diverso no disco, com um total de 424 espécies. A abundância relativa de bactérias variou significativamente entre os três grupos e os autores hipotetizaram a “disbiose” como possível etiologia da degeneração discal.^(85,87) O nosso estudo contribui para a literatura ao replicar a análise NGS no disco, embora encontrando um microbioma totalmente distinto. Futuros estudos devem não somente replicar a metodologia para verificar possíveis diferentes achados em termos de espécies, mas também buscar outros tipos de controles de comparação conforme possível. Rajasekaran et al. tiveram a sorte de poder comparar discos herniados e não herniados, o que talvez não fosse possível em nosso meio.

Discos herniados apresentam mudanças estruturais que os diferem de discos normais intocados.⁽⁸⁸⁾ O ânulo discal rompido expõe a estrutura interna do disco para a vascularização externa e não mais somente ao seu interior, formando uma potencial porta de entrada para patógenos. A herniação produz reação inflamatória intensa e neovascularização. Logo, nossos resultados refletem o possível microbioma de um disco herniado, não um disco intacto.

Nesta situação, o disco herniado pode ser apenas um tecido pelo qual o organismo ou restos de organismos detectados em nosso estudo passam, significando mais remanescentes de DNA bacteriano (em baixa carga) do que verdadeiros agentes infecciosos. Para haver positividade em cultura, as bactérias precisam estar íntegras e capazes de se reproduzir. A elevada sensibilidade do NGS leva ao achado dos chamados “vestígios” ou “remanescentes” bacterianos que estiveram presentes no passado — não necessariamente organismos viáveis ou que possam ser considerados infecciosos. O NGS já foi amplamente utilizado para avaliar o microbioma de amostras clínicas diferentes, tais como fezes, secreções respiratórias, líquido cefalorraquidiano e sangue. Entretanto, em amostras potencialmente estéreis, a identificação de sequências de DNA deve ser interpretada com cautela, já que poderiam representar remanescentes de DNA e não um verdadeiro agente infeccioso.

Não há definição de quantidade mínima de sequências mapeadas para determinar um achado significativamente positivo para o teste de NGS. Se houvesse sido incluído na análise do disco por NGS e eventualmente algum participante desenvolvesse infecção clínica durante o seguimento, poderia ter sido calculado o número mínimo e proposto nesse estudo. Inclusive, a inclusão de paciente com infecção discal prévia e culturas positivas como controle para o NGS poderia determinar melhor a concordância e significância desse exame, e definir qual o mínimo de sequências de DNA bacteriano que pode ser considerado como indicador de agente infeccioso. Nosso estudo excluiu pacientes com história prévia de infecção na coluna no seu protocolo inicial. Salipante et al. reportaram que o número de sequências de DNA mapeadas é diretamente proporcional ao número de bactérias infecciosas presentes na amostra e pode variar de 21 a 11.000 leituras.⁽⁶⁴⁾ Com base nesse estudo, nós consideramos que 20 leituras seriam nosso limite para considerar como significativa a identificação de um espécime patogênico.

No nosso estudo, encontramos esses remanescentes de uma rica presença multibacteriana em todas as 17 amostras enviadas para NGS. Um total de 45 tipos de bactérias diferentes foram identificados, ou seus remanescentes, com uma confiança maior que 70%, e cada amostra de disco apresentou média de oito bactérias diferentes. Entretanto, a representatividade das sequências mapeadas por bactéria foi muito baixa comparada com o número total de sequências mapeadas. O maior percentual de sequências mapeadas para uma única bactéria foi para o *Lactobacillus*, com 2,31% do total de sequências bacterianas mapeadas em apenas uma amostra de um paciente. Além do mais, isto representa 0,41% do total de sequências mapeadas neste mesmo paciente. Nenhum outro mapeamento alcançou mais do que 1% de sequências bacterianas em nenhum paciente e, em 12 (70%) amostras, nenhuma atingiu ao menos 0,2%.

Nós sabemos que o disco é um ambiente hostil, especialmente no seu interior, onde o núcleo pulposo tem baixas taxas de oxigênio, glicose e celularidade, ao mesmo tempo que apresenta altas taxas de ácido láctico e uma consequente diminuição do pH.⁽⁸⁹⁾ Estas características tornam a permeabilidade de solutos e sobrevivência de patógenos difícil. Além do mais, a nutrição do disco se dá por meio de difusão passiva e é dependente da permeabilidade da placa terminal, altura do disco e a própria capacidade de difusão do soluto.^(89,90) Singularidades dos solutos, tais como tamanho e peso molecular, definem sua capacidade de atingir o centro do disco, que poderia levar

até 24 horas, como já foi demonstrado com ressonância magnética.⁽⁹¹⁾ Isso pode influenciar o tempo e habilidade dos antibióticos de atingir o disco — e inclusive serve para questionar a influência que a cefuroxima, usada como antibiótico profilático nos nossos casos, teria sobre os resultados de cultura e microbioma do NGS no nosso estudo. Apesar de termos encontrado uma quantidade considerável de DNA de *Lactobacillus*, *Aerococcus*, e *Streptococcus* em algumas amostras de disco, nenhum desses pacientes apresentou infecção clínica até um ano após a cirurgia, o que corrobora a hipótese de que remanescentes de DNA bacteriano podem ser encontrados mesmo em amostras estéreis.

Curiosamente, o *C. acnes*, o agente mais citado como causador de infecção bacteriana, e alvo de busca desse estudo nas culturas de disco, não foi encontrado em nenhuma análise molecular. Embora tenhamos encontrado um microbioma bacteriano diverso no disco intervertebral, nós devemos interpretar isso com cautela e investigar qual seria o significado de cada elemento bacteriano detectado, em estudo com desenho apropriado para tal. A hipótese de que a fonte das bactérias encontradas no disco foi contaminação durante a cirurgia ou procedimentos de coleta e transporte das amostras foi em parte corroborada pela análise NGS. Remanescentes de *Bulkholderia species* foram identificados em todas as amostras de disco analisados por NGS. Estes são organismos do ambiente, que podem indicar contaminação.⁽⁶⁴⁾ *Bulkholderia species* são estritamente microrganismos anaeróbicos com baixa capacidade de crescimento no ambiente com baixa concentração de oxigênio. *Ralstonia pickettii* é um microrganismo também conhecido como contaminante de produtos biomédicos. Ele pode estar presente em reagentes utilizados no processo das amostras antes de ir para os estudos de análise molecular tais como PCR e NGS. Para evitar contaminação dos reagentes com DNA bacteriano, controles negativos foram utilizados para cada lote de sequenciamento e nenhuma amplificação foi observada nessas amostras.

A concordância entre os achados do NGS e da cultura já foram investigados em ortopedia. O NGS já foi utilizado no sistema musculoesquelético para detectar infecção de próteses de ombro em cirurgia de artroplastia.^(81,92,93) Em dois estudos, Namdari et al. demonstraram uma concordância fraca entre a cultura e o NGS de tecidos coletados em cirurgias primárias e de revisão de artroplastia de ombro.^(92,93) As culturas foram, na sua maioria, monomicrobianas, enquanto o resultado do NGS foi polimicrobiano. Em um segundo estudo,⁽⁹³⁾ foi encontrada concordância limitada

(kappa=0,238) entre o NGS e a cultura para identificar o *C. acnes*. De maneira semelhante, o *C. acnes* foi menos identificado por NGS do que na cultura. Em nossos pacientes com amostras submetidas a ambos cultura e NGS, não houve nenhuma amostra com cultura positiva para nenhuma bactéria e, apesar de os resultados do NGS terem sido polimicrobianos, não houve uma única sequência de *C. acnes* identificada por esse método.

Dois estudos muito recentes utilizaram o NGS em amostras de disco intervertebral.^(85,94) O primeiro investigou possível infecção viral. Walker et al.⁽⁹⁴⁾ buscaram por colonização de vírus no disco após a remoção de amostras em cirurgias de hérnia de disco. Havia 15 participantes, os autores não encontraram mais de um milhão de leituras por amostra, e nenhuma amostra continha leituras significativas de agentes virais humanos conhecidos. Foi concluído que é improvável que vírus estejam associados com hérnia de disco.

O segundo estudo, também usando NGS, foi o de Rajasekaran et al.⁽⁸⁵⁾ O remanescente bacteriano mais frequentemente encontrado no nosso estudo não foi nem sequer reportado entre as bactérias mais abundantes em nenhum dos grupos no estudo de Rajasekaran et al. Se compararmos o nosso grupo de pacientes com hérnia de disco com o grupo de hérnia de disco desses autores, há apenas cinco bactérias concomitantemente encontradas nos dois estudos (*Acinetobacter*, *Anoxybacillus*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*) — e apenas uma dessas espécies foi encontrada em mais do que uma amostra no nosso estudo (*Staphylococcus*). Enquanto *Herbaspirillum* foi detectado em todas as nossas amostras, só esteve presente em alguns discos normais no estudo de Rajasekaran et al. Entretanto, eles não reportaram a quantidade de leituras e sequências para que pudéssemos comparar os achados deles com os nossos e determinar quais os agentes infecciosos ou se seus remanescentes eram significativos. Além disso, o estudo deles não teve seguimento clínico para determinar infecção, por ter usado pacientes em morte cerebral. De qualquer maneira, há uma diferença óbvia do microbioma do disco intervertebral que pode estar relacionada a populações com diferenças étnicas e geográficas, significando colonizações discais diferentes. Nós não detectamos *C. acnes* no nosso estudo e tampouco foi o patógeno mais frequentemente reportado de longe por Rajasekaran et al.

O NGS se provou uma ferramenta valiosa para determinar infecção discal junto com a cultura de disco. Ele pode ajudar a identificar agentes em um disco com cultura negativa e poderá no futuro ser referência para guiar o uso de antibióticos.

Isso ainda não é realizado, já que ainda não é um teste validado com estudos de especificidade e sensibilidade para detectar infecção discal. *Next generation sequencing* possivelmente ajudará a entender melhor a colonização bacteriana de discos intervertebrais e sua relação com a degeneração do disco e a DLC no futuro. É capaz de evidenciar novos agentes infecciosos possíveis colonizando o disco além do “protagonista tradicional”, o *C. acnes*. A presença de inúmeros elementos bacterianos identificados com os testes de NGS necessita de validação clínica e sua relevância deve ser mais bem estudada. A baixa taxa de sequências bacterianas mapeadas no nosso estudo pode ser mais significativa para remanescentes de DNA de bactérias dos agentes infecciosos reais.

4.3 Alterações tipo Modic: o estudo de coorte

Investigamos, no nosso estudo de coorte, se alterações do tipo Modic um ano após a cirurgia estariam relacionadas com o achado de infecção ou contaminação do disco nos nossos pacientes. Alterações Modic são encontradas frequentemente em pacientes com hérnia discal⁽⁹⁵⁾ e associadas com degeneração discal e dor lombar. Essas alterações são consistentes com edema e poderiam ser secundárias a infecção por um organismo de baixa virulência.⁽⁹⁶⁾ Um exemplo de tal bactéria seria *C. acnes*, o que possivelmente explica a busca dos pesquisadores por uma associação entre infecção discal por *C. acnes* e alterações discais na imagem. Após algumas pesquisas em animais investigarem a plausibilidade biológica da associação,⁽⁹⁶⁾ estudos em humanos tiveram resultados controversos sobre a relação de infecção discal e alterações tipo Modic, de qualquer tipo ou especificamente do tipo I.^(95,96)

A colonização do disco por bactéria indolente poderia, teoricamente, acelerar o processo degenerativo, criar uma infecção de baixa virulência que se correlacionaria com lombalgia crônica e, também, com alteração dos platôs vertebrais observados nos estudos de imagem de ressonância magnética como Modic.^(20,41,42) Porém, pela taxa pequena de positividade de culturas de disco nos casos acompanhados neste estudo, não foi possível correlacionar a presença de bactérias com surgimento ou aumento das alterações de Modic ao longo do tempo de seguimento de um ano.

Esses pacientes com positividade de cultura de disco, ou seja, considerados com infecção discal, não apresentaram desfechos clínicos ou laboratoriais

outros. Não tiveram sintomas relacionados com infecção, como a febre ou dor lombar, estatisticamente diferente do esperado para o pós-operatório de hérnia de disco comparados com aqueles que não apresentaram positividade de cultura. Conforme relatado, uma minoria tinha comorbidades importantes que pudessem afetar a sintomatologia lombar, e poucos fumavam e bebiam. No entanto, dois terços dos pacientes estavam acima do peso ideal ou obesos e sabe-se que pacientes com IMC elevado têm maior chance de desenvolver infecção pós-operatória em cirurgia de coluna,⁽⁹⁵⁾ possivelmente pelas dificuldades técnicas impostas ao cirurgião e, também, por fatores pós-operatórios, como maior acúmulo de exsudato e secreções inflamatórias.

A ausência de evidência de associação possivelmente indica que os mecanismos que levam a essas alterações no exame de imagem envolvem fatores biomecânicos e genéticos⁽⁹⁵⁾ e não somente infecciosos.

4.4 Limitações e pontos positivos

Tanto o estudo transversal para investigação de *C. acnes* e por NGS quanto o de coorte de longo prazo neste projeto apresentam limitações. A principal delas é a ausência de um grupo de pacientes com o disco normal, sem indícios de degeneração discal, que permitiria fazer uma comparação ideal do ponto de vista experimental. No entanto, a coleta de amostra tecidual de indivíduos saudáveis, não submetidos a tratamento cirúrgico, dificilmente seria aprovada por um comitê de ética, já que a extração do tecido é procedimento invasivo (e, quando se trata de coluna, é uma região com grande potencial para eventos adversos). Uma possível solução seria a coleta de tecido discal de pacientes operados por afecções diferentes da coluna, como escoliose e trauma. Conforme já apontado por Iyer et al., a maioria das pesquisas buscando evidências de infecção em discos degenerados consiste em estudos transversais sem Grupo Controle,⁽⁹⁵⁾ e os que usam controles empregam tecidos diferentes, como musculares e ligamentares, tal como fizemos. Não temos registro, no entanto, de estudos usando disco saudável (não herniado) como controle para cultura bacteriana.

Nós também não estudamos outras regiões da coluna, tais como a cervical, que poderiam apresentar microbiotas diferentes comparadas com a coluna lombar. Em futuros estudos, poderão ser incluídos pacientes operados de hérnia de disco

situada em qualquer ponto da coluna, o que contribuirá para aumento do tamanho amostral geral e realização de NGS em todas as amostras.

A investigação utilizando a técnica NGS neste estudo tem algumas limitações. Uma delas é justamente o número pequeno de pacientes com amostras de disco submetidas ao exame de NGS, e da mesma população étnica e geográfica. Isso ocorreu pela proposta inicial do projeto, que focou na identificação do *C. acnes* por meio de cultura de tecidos. A introdução da técnica de NGS ocorreu durante a realização do projeto, como validação de um exame que não havia antes sido utilizado em amostras de disco intervertebral para complementar a cultura bacteriana, para confirmar ou excluir a etiologia infecciosa como fonte da doença degenerativa do disco. O exame não estava antes disponível em nossa instituição.

Outra limitação é a falta de um Grupo Controle positivo tal como pacientes com infecção comprovada do disco para correlacionar a cultura com os resultados de NGS. Os dois casos com infecção do disco detectada em cultura e os pacientes considerados como “contaminados” não foram avaliados por NGS, uma análise com limitações orçamentárias. A obtenção de financiamento específico para esse estudo pode resolver esse problema.

Finalmente, uma limitação maior foi o fato de não termos realizado NGS nos tecidos controles tais como o músculo local e o ligamento amarelo. Isto afeta a conclusão potencial já que seria intuitivo supor que, se o patógeno está apenas no disco, deveria estar envolvido na degeneração discal. Se o patógeno está no disco e nos tecidos ao seu redor, tais como o ligamento amarelo e os músculos profundos da coluna, poderíamos considerar que o ambiente degenerativo precede a cascata de eventos que afetam todo o nível intervertebral.

5 CONCLUSÕES

1. Os pacientes avaliados nesse projeto não expressaram, na grande maioria, positividade para a cultura bacteriana dos tecidos investigados (disco intervertebral, músculo multifídio e ligamento amarelo): mais de 88% eram negativos, e somente dois pacientes (1,8%) tinham positividade somente no disco (indicando infecção e não contaminação intraoperatória). Doze pacientes (10,7%) tiveram positividade dos tecidos controle e foram considerados casos de contaminação intraoperatória. Apenas três pacientes (2,7%) tinham cultura positiva no ligamento amarelo e 12 (10,7%) no músculo multifídio, indicando que a positividade no disco era devida a possível contaminação;

2. O patógeno focado neste estudo, *Cutibacterium acnes*, não foi identificado em nenhuma análise de microbioma de disco. A ausência de *C. acnes* do disco intervertebral foi confirmada pelo emprego da técnica NGS, utilizada na análise do microbioma de uma subamostra de 17 pacientes;

3. Dentre os dois pacientes com infecção no disco intervertebral, um teve cultura positiva para *Cutibacterium acnes* e o outro para *Staphylococcus aureus*;

4. Nossos resultados demonstraram que a análise do microbioma do disco intervertebral é uma ferramenta potencial para avaliar a infecção discal e entender melhor a etiologia infecciosa da degeneração discal, e o NGS se mostrou adequado para determinar isso. O DNA bacteriano detectado no disco intervertebral herniado foi muito escasso e sugere que poderia representar remanescentes do DNA mais do que um agente infeccioso ou o verdadeiro microbioma do disco;

5. Não foi observada associação significativa entre positividade para infecção dos tecidos e qualquer fator de prognóstico clínico;

6. Pela taxa pequena de positividade de culturas de disco nos casos acompanhados neste estudo, não foi possível correlacionar a presença de bactérias com surgimento ou aumento das alterações de Modic ao longo do tempo de seguimento de um ano.

6 APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Astur N, Maciel BF, Doi AM, Martino MD, Basqueira MS, Wajchenberg M, **Lenza M**, Martins DE. Next-generation sequencing (NGS) to determine microbiome of herniated intervertebral disc. Spine J. 2022;22(3):389-98. doi: 10.1016/j.spinee.2021.09.005.

7 MÉTRICAS

7.1 Métricas do periódico

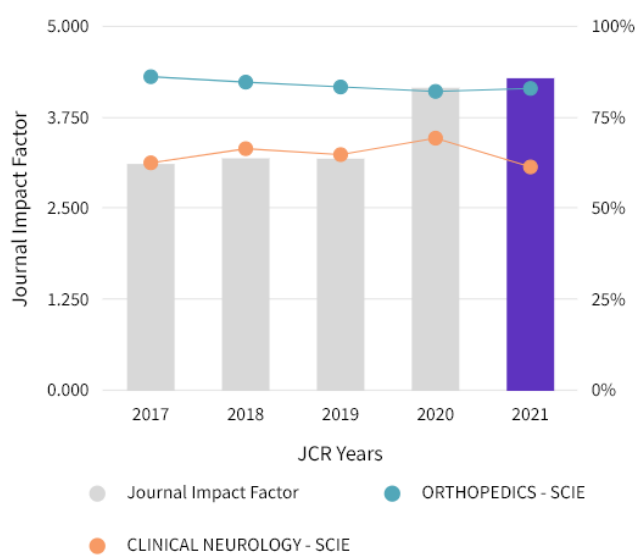
Métricas do periódico nos últimos cinco anos.

7.1.1 Fator de impacto

Periódico: Spine Journal

ISSN: 1529-9430 / 1878-1632

Fator de impacto 2021: 4.297



Fonte: Journal Citation Reports.

7.2 Métricas do artigo

7.2.1 Citações

Há uma citação para o artigo nas bases de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Google Scholar*, e duas citações em capítulos de livros.

Citação recebida	Scopus/Web of Science/Google Scholar	Capítulo de livro	Total
Chen X, Lu S, Chopra N, Cui P, Zhang S, Narulla R, et al. The association between low virulence organisms in different locations and intervertebral disc structural failure: a meta-analysis and systematic review. <i>JOR Spine</i> .2023;e1244.	1	0	1
Wang N, Tang T, Zhang X, Xi Z, Li J, Xie L. Knowledge areas and new trends in lumbar disc herniation research: bibliometrics and knowledge mapping analysis. <i>Indian J Orthop</i> . 2022;56(11):1918-1936.	1	0	1

Avaliação realizada em 25 de abril de 2023.

7.2.2 Altmetria

Dados altmétricos coletados em 25 de abril de 2023.

Escore	Variáveis	Quantidade
	Menções em rede	
	Twitter	1
	Members of the public	1
	Facebook	1
	Citações	
	Dimensions	2
	Artigo	2
	Leituras	14
	Mendeley	14

7.3 Métricas do autor

7.3.1 Redes científicas

Participação do autor nas redes científicas e seus respectivos endereços eletrônicos, onde o autor registra e disponibiliza suas publicações.

Rede científica	Link para acesso ao perfil
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2608-2118
Lattes	http://lattes.cnpq.br/6492715856784996
ScopusID	https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=55587167600
Publons/ ResearcherID	http://www.webofscience.com/wos/author/record/F-3267-2015
ResearchGate	https://www.researchgate.net/profile/Nelson-Astur
Google Scholar	https://scholar.google.com/citations?hl=pt-BR&user=84UvaHgAAAAJ
Academia.edu	https://fcmscsp.academia.edu/NelsonAstur

7.3.2 Trabalhos publicados

Trabalhos publicados e indexados na base de dados referencial *Web of Science*.

Publicações				
Ano	FI	Categoria	Referência	Citações
2023	2.230	Article	Camino-Willhuber G, Guiroy A, Servidio M, Astur N , Nin-Vilaró F, Alvarado-Gomez F, Daher M, Saciloto B, Ono A, Letaif O, Zarate-Kalfopulos B, Yurac R, Vialle E, Valacco M. Unplanned readmission following early postoperative complications after fusion surgery in adult spine deformity: a multicentric study. <i>Global Spine J.</i> 2023;13(1):74-80.	4
2022	Sem FI	Article	Astur N , Martins DE, Kanas M, Mendonça RG, Creek AT, Lenza M , et al. Quality assessment of systematic reviews of surgical treatment of cervical spine degenerative diseases: an overview. <i>einstein (Sao Paulo).</i> 2022;20:eAO6567.	0
2022	4.297	Article	Astur N , Maciel BF, Doi AM, Martino MD, Basqueira MS, Wajchenberg M, et al. Next-generation sequencing (NGS) to determine microbiome of herniated intervertebral disc. <i>Spine J.</i> 2022;22(3):389-98.	2

2022	2.721	Article	Willhuber G, Delgado B, Astur N , Guiroy A, Valacco M, Nasto LA, et al. An inter- and intra-rater agreement assessment of a novel classification of pyogenic spinal infections. <i>Eur Spine J.</i> 2022;31(2):448-53.	1
2022	2.687	Article	Haecker A, Ledezma C, Klaber I, Zamora T, Valencia M, Willhuber G, et al. Inter- and intra-observer agreement using the new AOSpine sacral fracture classification, with a comparison between spine and pelvic trauma surgeons. <i>Injury.</i> 2022;53(2):514-8.	1
2022	1.701	Article	Urrutia J, Willhuber G, Astur N , Valacco M, Borensztein M, Velan O, et al. An independent inter- and intra-observer agreement assessment of the Eno classification of sacroiliac joint degeneration. <i>Acta Radiol.</i> 2022;63(8):1071-6.	0
2021	4.297	Article	Urrutia J, Haecker A, Astur N , Valencia M, Yurac R, Willhuber G, et al. An independent inter- and intraobserver agreement assessment of the AOSpine sacral fracture classification system. <i>Spine J.</i> 2021;21(7):1143-8.	4
2021	2.230	Article	Camino Willhuber G, Guiroy A, Zamorano J, Astur N , Valacco M. Independent Reliability Analysis of a New Classification for Pyogenic Spondylodiscitis. <i>Global Spine J.</i> 2021;11(5):669-73.	5
2021	Sem FI	Article	Paiva TMM, Kanas M, Astur N , Wajchenberg M, Martins Filho DE. Correlation between previous sedentary lifestyle and CrossFit-related injuries. <i>einstein (Sao Paulo).</i> 2021;19:eAO5941.	2
2020	0.683	Article	Sorpreso RS, Martins DE, Kanas M, Sorpreso IC, Astur N , Wajchenberg M. Transforaminal intersomatic lumbar arthrodesis: comparison between autograft and cage in peek. <i>Acta Ortop Bras.</i> 2020;28(6):296-302.	0
2019	1.473	Image	Wajchenberg M, Astur N , Fernandes EA, Paredes-Gamero EJ, Luciano RP, Schmidt B, Oliveira AS, Martins DE. Assessment of fatty infiltration of the multifidus muscle in patients with adolescent idiopathic scoliosis through evaluation by magnetic resonance imaging compared with histological analysis: a diagnostic accuracy study. <i>J Pediatr Orthop B.</i> 2019;28(4):362-67.	9
2019	2.230	Review	Astur N , Avanzi O. Balloon kyphoplasty in the treatment of neoplastic spine lesions: a systematic review. <i>Global Spine J.</i> 2019;9(3):348-56.	12
2017	3.007	Article	Astur N , Martins DE, Wajchenberg M, Ferretti M, Menezes FG, Doi AM, et al. Subclinical <i>Propionibacterium acnes</i> infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort. <i>BMJ Open.</i> 2017;7(11):e017930.	3
2017	4.114	Article	Astur DC, Bernardes A, Castro S, Arliani GG, Kaleka CC, Astur N , et al. Functional outcomes after patellar autologous osteochondral	13

			transplantation. <i>Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.</i> 2017;25(10):3084-91.	
2016	Sem FI	Review	Wajchenberg M, Astur N , Kanas M, Martins DE. Adolescent idiopathic scoliosis: current concepts on neurological and muscular etiologies. <i>Scoliosis Spinal Disord.</i> 2016;11:4.	28
2016	4.297	Review	Martins DE, Astur N , Kanas M, Ferretti M, Lenza M , Wajchenberg M. Quality assessment of systematic reviews for surgical treatment of low back pain: an overview. <i>Spine J.</i> 2016;16(5):667-75.	13
2015	Sem FI	Article	Schueda MA, Astur DC, Bier RS, Bier DS, Astur N , Cohen M. Use of computed tomography to determine the risk of patellar dislocation in 921 patients with patellar instability. <i>Open Access J Sports Med.</i> 2015;6:55-62.	23
2015	2.537	Article	Rush JK, Astur N , Scott S, Kelly DM, Sawyer JR, Warner WC Jr. Use of magnetic resonance imaging in the evaluation of spondylolysis. <i>J Pediatr Orthop.</i> 2015;35(3):271-5.	22
2014	2.423	Article	Astur DC, Aleluia V, Veronese C, Astur N , Oliveira SG, Arliani GG, et al. A prospective double blinded randomized study of anterior cruciate ligament reconstruction with hamstrings tendon and spinal anesthesia with or without femoral nerve block. <i>Knee.</i> 2014;21(5):911-5.	14
2014	6.558	Article	Astur DC, Arliani GG, Binz M, Astur N , Kaleka CC, Amaro JT, et al. Autologous osteochondral transplantation for treating patellar chondral injuries: evaluation, treatment, and outcomes of a two-year follow-up study. <i>J Bone Joint Surg Am.</i> 2014;96(10):816-23.	31
2014	4.000	Review	Astur N , Sawyer JR, Klimo P Jr, Kelly DM, Muhlbauer M, Warner WC Jr. Traumatic atlanto-occipital dislocation in children. <i>J Am Acad Orthop Surg.</i> 2014;22(5):274-82.	10
2014	2.537	Article	Cannon TA, Astur Neto N , Kelly DM, Warner WC Jr, Sawyer JR. Characterization of radiation exposure in early-onset scoliosis patients treated with the vertical expandable prosthetic titanium rib. <i>J Pediatr Orthop.</i> 2014;34(2):179-84.	7
2014	2.537	Article	Astur N , Flynn JM, Flynn JM, Ramirez N, Glotzbecker M, van Bosse HJ, et al. The efficacy of rib-based distraction with VEPTR in the treatment of early-onset scoliosis in patients with arthrogryposis. <i>J Pediatr Orthop.</i> 2014;34(1):8-13.	12
2013	6.558	Article	Astur N , Klimo P Jr, Sawyer JR, Kelly DM, Muhlbauer MS, Warner WC Jr. Traumatic atlanto-occipital dislocation in children: evaluation, treatment, and outcomes. <i>J Bone Joint Surg Am.</i> 2013;95(24):e194(1-8).	21
2013	2.537	Article	Rush JK, Kelly DM, Astur N , Creek A, Dawkins R, Younas S, et al. Associated injuries in children and adolescents with spinal trauma. <i>J Pediatr Orthop.</i> 2013;33(4):393-7.	18
2013	5.973	Article	Astur DC, Santos CV, Aleluia V, Astur Neto N , Arliani GG, Kaleka CC, Skaf A, Cohen M.	11

			Characterization of cruciate ligament impingement: the influence of femoral or tibial tunnel positioning at different degrees of knee flexion. Arthroscopy. 2013;29(5):913-9.	
2013	2.713	Article	Klimo P Jr, Astur N , Gabrick K, Warner WC Jr, Muhlbauer MS. Occipitocervical fusion using a contoured rod and wire construct in children: a reappraisal of a vintage technique. J Neurosurg Pediatr. 2013;11(2):160-9.	20
2010	0.683	Article	Astur N , Lins RA, Kojima KE, Cunha BL, Hungria Neto JS, Mercadante MT, et al. Outcomes in treatment of diaphyseal femur fractures ipsilateral to the neck or transtrocanteric fracture. Acta Ortop. Bras. 2010;18(5):255-60.	1

7.3.3 Mediana do fator de impacto dos trabalhos publicados

Fator de impacto das publicações	Mediana
0.000	2.537
0.000	
0.000	
0.000	
0.683	
0.683	
1.473	
1.701	
2.230	
2.230	
2.230	
2.423	
2.537	
2.537	
2.537	
2.537	
2.687	
2.713	
2.721	
3.007	
4.000	
4.114	
4.297	
4.297	
4.297	
5.973	
6.558	
6.558	

7.3.4 Citações recebidas

Publicações x Citações		
Ano	Publicações	Citações
2010	1	1
2013	4	70
2014	5	74
2015	2	45
2016	2	41
2017	2	16
2019	2	21
2020	1	0
2021	3	11
2022	5	4
2023	1	4
Total	28	287

7.3.5 H-index e m-quociente

Cálculo do h-index	
Tópicos	Dados
Quantidade de publicações:	28
Soma do número de citações:	287
Artigos que receberam citações:	27
Média de citações por item:	10,6
h-index:	12

Cálculo do m-quociente		
h-index	12	1,09
Número de anos de publicação	11	

Publicações – h-index				
Ano	FI	Categoria	Referência	Citações
2014	6.558	Article	Astur DC, Arliani GG, Binz M, Astur N , Kaleka CC, Amaro JT, et al. Autologous osteochondral transplantation for treating patellar chondral injuries: evaluation, treatment, and outcomes of a two-year follow-up study. J Bone Joint Surg Am. 2014;96(10):816-23.	31
2016	Sem FI	Review	Wajchenberg M, Astur N , Kanas M, Martins DE. Adolescent idiopathic scoliosis: current concepts on neurological and muscular etiologies. Scoliosis Spinal Disord. 2016;11:4.	28
2015	Sem FI	Article	Schueda MA, Astur DC, Bier RS, Bier DS, Astur N , Cohen M. Use of computed tomography to determine the risk of patellar dislocation in 921 patients with patellar instability. Open Access J Sports Med. 2015;6:55-62.	23
2015	2.537	Article	Rush JK, Astur N , Scott S, Kelly DM, Sawyer JR, Warner WC Jr. Use of magnetic resonance imaging in the evaluation of spondylolysis. J Pediatr Orthop. 2015;35(3):271-5.	22
2013	6.558	Article	Astur N , Klimo P Jr, Sawyer JR, Kelly DM, Muhlbauer MS, Warner WC Jr. Traumatic atlanto-occipital dislocation in children: evaluation, treatment, and outcomes. J Bone Joint Surg Am. 2013;95(24):e194(1-8).	21
2013	2.713	Article	Klimo P Jr, Astur N , Gabrick K, Warner WC Jr, Muhlbauer MS. Occipitocervical fusion using a contoured rod and wire construct in children: a reappraisal of a vintage technique. J Neurosurg Pediatr. 2013;11(2):160-9.	20
2013	2.537	Article	Rush JK, Kelly DM, Astur N , Creek A, Dawkins R, Younas S, et al. Associated injuries in children and adolescents with spinal trauma. J Pediatr Orthop. 2013;33(4):393-7.	18
2014	2.423	Article	Astur DC, Aleluia V, Veronese C, Astur N , Oliveira SG, Arliani GG, et al. A prospective double blinded randomized study of anterior cruciate ligament reconstruction with hamstrings tendon and spinal anesthesia with or without femoral nerve block. Knee. 2014;21(5):911-5.	14
2017	4.114	Article	Astur DC, Bernardes A, Castro S, Arliani GG, Kaleka CC, Astur N , et al. Functional outcomes after patellar autologous osteochondral transplantation. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2017;25(10):3084-91.	13
2016	4.297	Review	Martins DE, Astur N , Kanas M, Ferretti M, Lenza M , Wajchenberg M. Quality assessment of systematic reviews for surgical treatment of low back pain: an overview. Spine J. 2016;16(5):667-75.	13
2019	2.230	Review	Astur N , Avanzi O. Balloon kyphoplasty in the treatment of neoplastic spine lesions: a systematic review. Global Spine J. 2019;9(3):348-56.	12
2014	2.537	Article	Astur N , Flynn JM, Flynn JM, Ramirez N, Glotzbecker M, van Bosse HJ, et al. The efficacy of rib-based distraction with VEPTR in the	12

			treatment of early-onset scoliosis in patients with arthrogryposis. J Pediatr Orthop. 2014;34(1):8-13.	
2013	5.973	Article	Astur DC, Santos CV, Aleluia V, Astur Neto N , Arliani GG, Kaleka CC, Skaf A, Cohen M. Characterization of cruciate ligament impingement: the influence of femoral or tibial tunnel positioning at different degrees of knee flexion. Arthroscopy. 2013;29(5):913-9.	11
2014	4.000	Review	Astur N , Sawyer JR, Klimo P Jr, Kelly DM, Muhlbauer M, Warner WC Jr. Traumatic atlanto-occipital dislocation in children. J Am Acad Orthop Surg. 2014;22(5):274-82.	10
2019	1.473	Image	Wajchenberg M, Astur N , Fernandes EA, Paredes-Gamero EJ, Luciano RP, Schmidt B, Oliveira AS, Martins DE. Assessment of fatty infiltration of the multifidus muscle in patients with adolescent idiopathic scoliosis through evaluation by magnetic resonance imaging compared with histological analysis: a diagnostic accuracy study. J Pediatr Orthop B. 2019;28(4):362-7.	9
2014	2.537	Article	Cannon TA, Astur Neto N , Kelly DM, Warner WC Jr, Sawyer JR. Characterization of radiation exposure in early-onset scoliosis patients treated with the vertical expandable prosthetic titanium rib. J Pediatr Orthop. 2014;34(2):179-84.	7
2021	2.230	Article	Camino Willhuber G, Guiroy A, Zamorano J, Astur N , Valacco M. Independent reliability analysis of a new classification for pyogenic spondylodiscitis. Global Spine J. 2021;11(5):669-73.	5
2021	4.297	Article	Urrutia J, Haecker A, Astur N , Valencia M, Yurac R, Willhuber G, et al. An independent inter- and intraobserver agreement assessment of the AOSpine sacral fracture classification system. Spine J. 2021;21(7):1143-8.	4
2023	2.230	Article	Camino-Willhuber G, Guiroy A, Servidio M, Astur N , Nin-Vilaró F, Alvarado-Gomez F, Daher M, Saciloto B, Ono A, Letaif O, Zarate-Kalfopulos B, Yurac R, Vialle E, Valacco M. Unplanned readmission following early postoperative complications after fusion surgery in adult spine deformity: a multicentric study. Global Spine J. 2023;13(1):74-80.	4
2017	3.007	Article	Astur N , Martins DE, Wajchenberg M, Ferretti M, Menezes FG, Doi AM, et al. Subclinical Propionibacterium acnes infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort. BMJ Open. 2017;7(11):e017930.	3
2022	4.297	Article	Astur N , Maciel BF, Doi AM, Martino MD, Basqueira MS, Wajchenberg M, et al. Next-generation sequencing (NGS) to determine microbiome of herniated intervertebral disc. Spine J. 2022;22(3):389-98.	2
2021	Sem FI	Article	Paiva TMM, Kanas M, Astur N , Wajchenberg M, Martins Filho DE. Correlation between previous sedentary lifestyle and CrossFit-related injuries. einstein (Sao Paulo). 2021;19:eAO5941.	2

2022	2.721	Article	Willhuber G, Delgado B, Astur N , Guiroy A, Valacco M, Nasto LA, et al. An inter- and intra-rater agreement assessment of a novel classification of pyogenic spinal infections. <i>Eur Spine J.</i> 2022;31(2):448-53.	1
2022	2.687	Article	Haecker A, Ledezma C, Klaber I, Zamora T, Valencia M, Willhuber G, et al. Inter- and intra-observer agreement using the new AOSpine sacral fracture classification, with a comparison between spine and pelvic trauma surgeons. <i>Injury.</i> 2022;53(2):514-8.	1
2010	0.683	Article	Astur N ; Lins RA; Kojima KE; Cunha BL; Hungria Neto JS, Mercadante MT; et al. Outcomes in treatment of diaphyseal femur fractures ipsilateral to the neck or transtrochanteric fracture. <i>Acta ortop. bras.</i> 2010;18(5):255-60.	1
2022	1.701	Article	Urrutia J, Willhuber G, Astur N , Valacco M, Borensztein M, Velan O, et al. An independent inter- and intra-observer agreement assessment of the Eno classification of sacroiliac joint degeneration. <i>Acta Radiol.</i> 2022;63(8):1071-6.	0
2020	0.683	Article	Sorpreso RS, Martins DE, Kanas M, Sorpreso IC, Astur N , Wajchenberg M. Transforaminal intersomatic lumbar arthrodesis: comparison between autograft and cage in peek. <i>Acta Ortop Bras.</i> 2020;28(6):296-302.	0
2022	Sem FI	Article	Astur N , Martins DE, Kanas M, Mendonça RG, Creek AT, Lenza M , et al. Quality assessment of systematic reviews of surgical treatment of cervical spine degenerative diseases: an overview. <i>einstein (Sao Paulo).</i> 2022;20:eAO6567.	0

8 REFERÊNCIAS

1. Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo award winner in basic science studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine*. 2001;26(23):2543–9.
2. Sivan SS, Wachtel E, Roughley P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(10):3181–9.
3. Adams MA, McNally DS, Dolan P. ‘Stress’ distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br*. 1996;78(6):965–72.
4. Roberts S, Evans EH, Kletsas D, Jaffray DC, Eisenstein SM. Senescence in human intervertebral discs. *Eur Spine J*. 2006;15 Suppl 3:S312-6.
5. Oei MW, Evens AL, Bhatt AA, Garner HW. Imaging of the aging spine. *Radiol Clin North Am*. 2022;60(4):629–40.
6. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al.; GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789–858.
7. Foster NE, Anema JR, Cherkin D, Chou R, Cohen SP, Gross DP, et al.; Lancet low back pain series working group. Prevention and treatment of low back pain: evidence, challenges, and promising directions. *Lancet*. 2018;391(10137):2368–83.
8. Krismer M, van Tulder M; Low Back Pain Group of the Bone and Joint Health Strategies for Europe Project. Strategies for prevention and management of musculoskeletal conditions. Low back pain (non-specific). *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007;21(1):77–91.
9. Werber A, Zimmermann-Stenzel M, Moradi B, Neubauer E, Schiltenswolf M. Awareness of the German population of common available guidelines of how to cope with lower back pain. *Pain Physician*. 2014;17(3):217–26.
10. Määtä JH, Wadge S, MacGregor A, Karppinen J, Williams FM. ISSLS Prize winner: vertebral endplate (Modic) change is an independent risk factor for episodes of severe and disabling low back pain. *Spine*. 2015;40(15):1187–93.
11. Saukkonen J, Määtä J, Oura P, Kyllönen E, Tervonen O, Niinimäki J, et al. Association between Modic changes and low back pain in middle age: a northern finland birth cohort study. *Spine*. 2020;45(19):1360–7.
12. Roos A, Kressel H, Spritzer C, Dalinka M. MR imaging of marrow changes adjacent to end plates in degenerative lumbar disk disease. *AJR Am J Roentgenol*. 1987;149(3):531–4.
13. Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, Masaryk TJ, Carter JR. Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology*. 1988;166(1 Pt 1):193–9.
14. Modic MT, Masaryk TJ, Ross JS, Carter JR. Imaging of degenerative disk disease. *Radiology*. 1988;168(1):177–86.
15. Weishaupt D, Zanetti M, Hodler J, Min K, Fuchs B, Pfirrmann CW, et al. Painful lumbar disk derangement: relevance of endplate abnormalities at mr imaging. *Radiology*. 2001;218(2):420–7.
16. Kuisma M, Karppinen J, Niinimäki J, Ojala R, Haapea M, Heliövaara M, et al. Modic changes in endplates of lumbar vertebral bodies: prevalence and association with low back and sciatic pain among middle-aged male workers. *Spine*. 2007;32(10):1116–22.

17. Brown MF, Hukkanen MV, McCarthy ID, Redfern DR, Batten JJ, Crock HV, et al. Sensory and sympathetic innervation of the vertebral endplate in patients with degenerative disc disease. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79(1):147–53.
18. Burke JG, Watson RW, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(2):196–201.
19. Crock HV. Internal disc disruption. A challenge to disc prolapse fifty years on. *Spine.* 1986;11(6):650–3.
20. Albert HB, Sorensen JS, Christensen BS, Manniche C. Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy. *Eur Spine J.* 2013;22(4):697–707.
21. Kjaer P, Leboeuf-Yde C, Korsholm L, Sorensen JS, Bendix T. Magnetic resonance imaging and low back pain in adults: a diagnostic imaging study of 40-year-old men and women. *Spine.* 2005;30(10):1173–80.
22. Mitra D, Cassar-Pullicino VN, McCall IW. Longitudinal study of vertebral type-1 end-plate changes on MR of the lumbar spine. *Eur Radiol.* 2004;14(9):1574–81.
23. Rahme R, Moussa R. The Modic vertebral endplate and marrow changes: pathologic significance and relation to low back pain and segmental instability of the lumbar spine. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(5):838–42.
24. Karchevsky M, Schweitzer ME, Carrino JA, Zoga A, Montgomery D, Parker L. Reactive endplate marrow changes: a systematic morphologic and epidemiologic evaluation. *Skeletal Radiol.* 2005;34(3):125–9.
25. Rollason J, McDowell A, Albert HB, Barnard E, Worthington T, Hilton AC, et al. Genotypic and antimicrobial characterisation of *Propionibacterium acnes* isolates from surgically excised lumbar disc herniations. *BioMed Res Int.* 2013;2013:530382.
26. Ponraj DS, Lange J, Falstie-Jensen T, Jørgensen NP, Ravn C, Poehlein A, et al. Amplicon-based next-generation sequencing as a diagnostic tool for the detection of phylotypes of *Cutibacterium acnes* in orthopedic implant-associated infections. *Front Microbiol.* 2022;13:866893.
27. Leheste JR, Ruvolo KE, Chrostowski JE, Rivera K, Husko C, Miceli A, et al. *P. acnes*-driven disease pathology: current knowledge and future directions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:81.
28. Perry A, Lambert P. *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(12):1149–56.
29. Pottinger P, Butler-Wu S, Neradilek MB, Merritt A, Bertelsen A, Jette JL, et al. Prognostic factors for bacterial cultures positive for *Propionibacterium acnes* and other organisms in a large series of revision shoulder arthroplasties performed for stiffness, pain, or loosening. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(22):2075–83.
30. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al.; NISC Comparative Sequencing Program. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 2009;324(5931):1190–2.
31. Liu PF, Hsieh YD, Lin YC, Two A, Shu CW, Huang CM. *Propionibacterium acnes* in the pathogenesis and immunotherapy of acne vulgaris. *Curr Drug Metab.* 2015;16(4):245–54.
32. Portillo ME, Corvec S, Borens O, Trampuz A. *Propionibacterium acnes*: an underestimated pathogen in implant-associated infections. *BioMed Res Int.* 2013;2013:804391.
33. Chen Z, Cao P, Zhou Z, Yuan Y, Jiao Y, Zheng Y. Overview: the role of *Propionibacterium acnes* in nonpyogenic intervertebral discs. *Int Orthop.* 2016;40(6):1291–8.

34. Albert HB, Kjaer P, Jensen TS, Sorensen JS, Bendix T, Manniche C. Modic changes, possible causes and relation to low back pain. *Med Hypotheses*. 2008;70(2):361–8.
35. Capoor MN, Birkenmaier C, Wang JC, McDowell A, Ahmed FS, Brüggemann H, et al. A review of microscopy-based evidence for the association of *Propionibacterium acnes* biofilms in degenerative disc disease and other diseased human tissue. *Eur Spine J*. 2019;28(12):2951–71.
36. Capoor MN, Ruzicka F, Schmitz JE, James GA, Machackova T, Jancalek R, et al. *Propionibacterium acnes* biofilm is present in intervertebral discs of patients undergoing microdiscectomy. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174518.
37. Chen Z, Zheng Y, Yuan Y, Jiao Y, Xiao J, Zhou Z, et al. Modic changes and disc degeneration caused by inoculation of *propionibacterium acnes* inside intervertebral discs of rabbits: a pilot study. *BioMed Res Int*. 2016;2016:9612437.
38. Gilligan CJ, Cohen SP, Fischetti VA, Hirsch JA, Czaplewski LG. Chronic low back pain, bacterial infection and treatment with antibiotics. *Spine J*. 2021;21(6):903–14.
39. Capoor MN, Ruzicka F, Machackova T, Jancalek R, Smrcka M, Schmitz JE, et al. Prevalence of *propionibacterium acnes* in intervertebral discs of patients undergoing lumbar microdiscectomy: a prospective cross-sectional study. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161676.
40. Albert HB, Lambert P, Rollason J, Sorensen JS, Worthington T, Pedersen MB, et al. Does nuclear tissue infected with bacteria following disc herniations lead to Modic changes in the adjacent vertebrae? *Eur Spine J*. 2013;22(4):690–6.
41. Manniche C, Jordan A. 10 years of research: from ignoring Modic changes to considerations regarding treatment and prevention of low-grade disc infections. *Future Sci OA*. 2016;2(2):FSO117.
42. Manniche C, O'Neill S. New insights link low-virulent disc infections to the etiology of severe disc degeneration and Modic changes. *Future Sci OA*. 2019;5(5):FSO389.
43. Stirling A, Worthington T, Rafiq M, Lambert PA, Elliott TS. Association between sciatica and *Propionibacterium acnes*. *Lancet*. 2001;357(9273):2024–5.
44. Agarwal V, Golish SR, Alamin TF. Bacteriologic culture of excised intervertebral disc from immunocompetent patients undergoing single level primary lumbar microdiscectomy. *J Spinal Disord Tech*. 2011;24(6):397–400.
45. Arndt J, Charles YP, Koebel C, Bogorin I, Steib JP. Bacteriology of degenerated lumbar intervertebral disks. *J Spinal Disord Tech*. 2012;25(7):E211–6.
46. Zhou Z, Chen Z, Zheng Y, Cao P, Liang Y, Zhang X, et al. Relationship between annular tear and presence of *Propionibacterium acnes* in lumbar intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2015;24(11):2496–502.
47. Yuan Y, Zhou Z, Jiao Y, Li C, Zheng Y, Lin Y, et al. Histological identification of *propionibacterium acnes* in nonpyogenic degenerated intervertebral discs. *BioMed Res Int*. 2017;2017:6192935.
48. Fritzell P, Bergström T, Welinder-Olsson C. Detection of bacterial DNA in painful degenerated spinal discs in patients without signs of clinical infection. *Eur Spine J*. 2004;13(8):702–6.
49. Ben-Galim P, Rand N, Giladi M, Schwartz D, Ashkenazi E, Millgram M, et al. Association between sciatica and microbial infection: true infection or culture contamination? *Spine*. 2006;31(21):2507–9.
50. Carricajo A, Nuti C, Aubert E, Hatem O, Fonsale N, Mallaval FO, et al. *Propionibacterium acnes* contamination in lumbar disc surgery. *J Hosp Infect*. 2007;66(3):275–7.

51. Rigal J, Thelen T, Byrne F, Cogniet A, Boissière L, Aunoble S, et al. Prospective study using anterior approach did not show association between Modic 1 changes and low grade infection in lumbar spine. *Eur Spine J.* 2016;25(4):1000–5.
52. Fritzell P, Welinder-Olsson C, Jönsson B, Melhus Å, Andersson SG, Bergström T, et al. Bacteria: back pain, leg pain and Modic sign-a surgical multicentre comparative study. *Eur Spine J.* 2019;28(12):2981–9.
53. Bråten LC, Rolfsen MP, Espeland A, Wigemyr M, Aßmus J, Froholdt A, et al.; AIM study group. Efficacy of antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and Modic changes (the AIM study): double blind, randomised, placebo controlled, multicentre trial. *BMJ.* 2019;367:l5654.
54. Hospital Israelita Albert Einstein. Subclinical propionibacterium acnes infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): a prospective cohort [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 Sep [cited 2022 Dec 21]. Report No.: NCT03158766. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03158766>
55. Astur N, Martins DE, Wajchenberg M, Ferretti M, Menezes FG, Doi AM, et al. Subclinical Propionibacterium acnes infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort. *BMJ Open.* 2017;7(11):e017930.
56. Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, et al.; STROBE Initiative. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2007;4(10):e297.
57. Childs JD, Piva SR, Fritz JM. Responsiveness of the numeric pain rating scale in patients with low back pain. *Spine.* 2005;30(11):1331–4.
58. Vigatto R, Alexandre NM, Correa Filho HR. Development of a Brazilian Portuguese version of the Oswestry disability index: cross-cultural adaptation, reliability, and validity. *Spine.* 2007;32(4):481–6.
59. Ferreira LN, Ferreira PL, Pereira LN, Oppe M. EQ-5D Portuguese population norms. *Qual Life Res.* 2014;23(2):425–30.
60. Santos M, Monteiro AL, Santos B. EQ-5D Brazilian population norms. *Health Qual Life Outcomes.* 2021;19(1):162.
61. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al.; Infectious Diseases Society of America. Executive summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2013;56(1):1–10.
62. Oprica C, Emtestam L, Lapins J, Borglund E, Nyberg F, Stenlund K, et al. Antibiotic-resistant Propionibacterium acnes on the skin of patients with moderate to severe acne in Stockholm. *Anaerobe.* 2004;10(3):155–64.
63. Astur N, Maciel BF, Doi AM, Martino MD, Basqueira MS, Wajchenberg M, et al. Next-generation sequencing (NGS) to determine microbiome of herniated intervertebral disc. *Spine J.* 2022;22(3):389–98.
64. Salipante SJ, Sengupta DJ, Rosenthal C, Costa G, Spangler J, Sims EH, et al. Rapid 16S rRNA next-generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections. *PLoS One.* 2013;8(5):e65226.
65. Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM, Rosseland LA, Romundstad L, Hals EK, et al. Assessment of pain. *Br J Anaesth.* 2008;101(1):17–24.
66. Ritter PL, González VM, Laurent DD, Lorig KR. Measurement of pain using the visual numeric scale. *J Rheumatol.* 2006;33(3):574–80.

67. Gagliese L, Weizblit N, Ellis W, Chan VW. The measurement of postoperative pain: a comparison of intensity scales in younger and older surgical patients. *Pain*. 2005;117(3):412–20.
68. Suzuki H, Aono S, Inoue S, Imajo Y, Nishida N, Funaba M, et al. Clinically significant changes in pain along the pain intensity numerical rating scale in patients with chronic low back pain. *PLoS One*. 2020;15(3):e0229228.
69. Solberg T, Johnsen LG, Nygaard ØP, Grotle M. Can we define success criteria for lumbar disc surgery? estimates for a substantial amount of improvement in core outcome measures. *Acta Orthop*. 2013;84(2):196–201.
70. Hägg O, Fritzell P, Nordwall A; Swedish Lumbar Spine Study Group. The clinical importance of changes in outcome scores after treatment for chronic low back pain. *Eur Spine J*. 2003;12(1):12–20.
71. Alcohol drinking. Biological data relevant to the evaluation of carcinogenic risk to humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1988;44:101–52.
72. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1–1438.
73. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D; Million Women Study Collaboration. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the million women study: cohort study. *BMJ*. 2007;335(7630):1134.
74. Jensen TS, Karppinen J, Sorensen JS, Niinimäki J, Leboeuf-Yde C. Vertebral endplate signal changes (Modic change): a systematic literature review of prevalence and association with non-specific low back pain. *Eur Spine J*. 2008;17(11):1407–22.
75. IBM SPSS Statistics for Windows [computer program]. Version 24.0. Armonk (NY): IBM; 2016.
76. Ahmed-Yahia S, Decousser JW, Flouzat-Lachaniette CH, Dervin G, Roubineau F, Audureau E, et al. Is the discopathy associated with Modic changes an infectious process? Results from a prospective monocenter study. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221030.
77. Wedderkopp N, Thomsen K, Manniche C, Kolmos HJ, Jensen TS, Leboeuf YC. No evidence for presence of bacteria in Modic type I changes. *Acta Radiol*. 2009;50(1):65–70.
78. Brinjikji W, Luetmer PH, Comstock B, Bresnahan BW, Chen LE, Deyo RA, et al. Systematic literature review of imaging features of spinal degeneration in asymptomatic populations. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36(4):811–6.
79. Brinjikji W, Diehn FE, Jarvik JG, Carr CM, Kallmes DF, Murad MH, et al. MRI Findings of disc degeneration are more prevalent in adults with low back pain than in asymptomatic controls: a systematic review and meta-analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36(12):2394–9.
80. Rajasekaran S, Tangavel C, K S SV, Soundararajan DC, Nayagam SM, Matchado MS, et al. Inflammation determines health and disease in lumbar discs-evidence from differing proteomic signatures of healthy, aging, and degenerating discs. *Spine J*. 2020;20(1):48–59.
81. Rao PJ, Phan K, Reddy R, Scherman DB, Taylor P, Mobbs RJ. DISC (Degenerate-disc infection study with contaminant control): pilot study of Australian cohort of patients without the contaminant control. *Spine*. 2016;41(11):935–9.
82. McLorinan GC, Glenn JV, McMullan MG, Patrick S. *Propionibacterium acnes* wound contamination at the time of spinal surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;(437):67–73.
83. Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB, Nagarajan H, Zengler K, Gallo RL. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nat Commun*. 2013;4(1):1431.
84. McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ. Regional variations of cutaneous propionibacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1978;35(1):62–6.

85. Rajasekaran S, Soundararajan DC, Tangavel C, Muthurajan R, Sri Vijay Anand KS, Matchado MS, et al. Human intervertebral discs harbour a unique microbiome and dysbiosis determines health and disease. *Eur Spine J.* 2020;29(7):1621–40.
86. Rajasekaran S, Tangavel C, Aiyer SN, Nayagam SM, Raveendran M, Demonte NL, et al. ISSLS prize in clinical science 2017: is infection the possible initiator of disc disease? An insight from proteomic analysis. *Eur Spine J.* 2017;26(5):1384–400.
87. Rajasekaran S, Tangavel C, Vasudevan G, Easwaran M, Muthurajan R, K S SV, et al. Bacteria in human lumbar discs - subclinical infection or contamination? Metabolomic evidence for colonization, multiplication, and cell-cell cross-talk of bacteria. *Spine J.* 2023;23(1):163–77.
88. Kirkaldy-Willis WH, Wedge JH, Yong-Hing K, Reilly J. Pathology and pathogenesis of lumbar spondylosis and stenosis. *Spine.* 1978;3(4):319–28.
89. Grunhagen T, Wilde G, Soukane DM, Shirazi-Adl SA, Urban JP. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88 Suppl 2:30–5.
90. Soukane DM, Shirazi-Adl A, Urban JP. Analysis of nonlinear coupled diffusion of oxygen and lactic acid in intervertebral discs. *J Biomech Eng.* 2005;127(7):1121–6.
91. Rajasekaran S, Babu JN, Arun R, Armstrong BR, Shetty AP, Murugan S. ISSLS prize winner: a study of diffusion in human lumbar discs: a serial magnetic resonance imaging study documenting the influence of the endplate on diffusion in normal and degenerate discs. *Spine.* 2004;29(23):2654–67.
92. Namdari S, Nicholson T, Abboud J, Lazarus M, Ramsey ML, Williams G, et al. Comparative study of cultures and next-generation sequencing in the diagnosis of shoulder prosthetic joint infections. *J Shoulder Elbow Surg.* 2019;28(1):1–8.
93. Namdari S, Nicholson T, Abboud J, Lazarus M, Ramsey ML, Williams G, et al. *Cutibacterium acnes* is less commonly identified by next-generation sequencing than culture in primary shoulder surgery. *Shoulder Elbow.* 2020;12(3):170–7.
94. Walker BF, Armson AJ, O'Dea MA, White JR, Lind CR, Woodland PR. Are viruses associated with disc herniation? A clinical case series. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020;21(1):27.
95. Iyer S, Louie PK, Nolte MT, Phillips FM. The Relationship between low-grade infection and degenerative disk disease: a review of basic science and clinical data. *J Am Acad Orthop Surg.* 2019;27(14):509–18.
96. Khalil JG, Gandhi SD, Park DK, Fischgrund JS. *Cutibacterium acnes* in spine pathology: pathophysiology, diagnosis, and management. *J Am Acad Orthop Surg.* 2019;27(14):e633–40.

Abstract

Introduction: *Cutibacterium acnes* is a bacterium naturally present on the skin and other parts of the human body. The role of *C. acnes* (formerly known as *Propionibacterium acnes*) in the pathophysiology of acne is well established, but there are reports of this organism as the pathogen responsible for inflammatory conditions and postoperative infection with or without implants. *C. acnes* has been described as causing Modic type 1 changes on spinal magnetic resonance imaging (MRI), and this bacterium has been isolated in cultures of intervertebral disc samples. **Purpose:** The main objective of this study is to investigate the prevalence of bacterial infection, specifically *C. acnes*, in samples of the intervertebral disc, multifidus muscle and ligamentum flavum (as an indication of contamination) of patients with lumbar disc herniation; to investigate prognostic factors of patients with positivity for infection or contamination and evaluate the relationship of radiological modifications (Modic types I and II) with infection one year after surgery for disc herniation. **Methods:** A cross-sectional study and a prospective cohort study were performed at a single center at the Hospital Israelita Albert Einstein, in which patients consecutively operated on for disc herniation had samples of the disc, multifidus muscle and ligamentum flavum extracted for culture. Patients were assessed for function and pain before surgery and also by MRI one year later for characterization of Modic changes. A subsample of 17 patients underwent next generation sequencing molecular analysis. Descriptive analysis and comparison of groups of patients with and without infection or contamination were performed using Student's t, Mann-Whitney, chi-square, or Fisher's exact tests as appropriate, and pre- and post-surgical comparisons for Modic with the Wilcoxon test. **Results:** From January 2018 to September 2019, 112 patients with lumbar disc herniation underwent open microdiscectomy and were included in the study, 67 (59.8%) men. The result of tissue cultures showed a minority with positivity for any bacterial growth (14 cases, 12.5%), 3 (2.7%) with positive culture in the ligament, 7 (6.3%) in the disc and 12 (10.7%) in the muscle. Two patients had *C. acnes* cultured from a disc sample. The low positivity prevented the investigation of the relationships between clinical prognostic factors and infection. No evidence of Modic alterations was found between patients with and without bacterial growth in culture, regardless of the period, pre- or post-operatively. There were no clinical, pain, or functional differences between patients with and without disc infection or contamination.

All 17 patients who underwent next generation sequencing had a negative disc culture for *C. acnes*, as well as a negative culture for muscle and ligamentum flavum. Thus, none of these patients was considered to have infection or contamination. **Conclusions:** The fact that only 2 patients (1.6%) were positive for *Cutibacterium acnes* in the disc only, and 3 patients (2.7%) had a positive culture in the ligamentum flavum and 12 (10.7%) in the multifidus muscle indicates that the disc positivity was due to possible contamination. *C. acnes* was not identified in any disk microbiome analysis. No significant association was observed between positivity for tissue infection and any clinical prognostic factor.

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03158766

Keywords: *Propionibacterium acnes*; *Cutibacterium acnes*; Intervertebral disk displacement; Intervertebral disc degeneration; Infection

Apêndice 1. Protocolo do estudo publicado *British Medical Journal Open* em 2017 [Fator de Impacto: 3,007 (2021)]

Open Access

Protocol

BMJ Open Subclinical *Propionibacterium acnes* infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort

Nelson Astur,¹ Delio E Martins,¹ Marcelo Wajchenberg,¹ Mario Ferretti,¹ Fernando G Menezes,² Andre M Doi,³ Laercio A Rosemberg,⁴ Durval C B Santos,⁴ Alexandre S Iutaka,¹ Luciano M R Rodrigues,¹ Marínes D V Martino,³ Jorge R Pagura,¹ Eduardo N Kihara Filho,⁴ Mario Lenza¹

To cite: Astur N, Martins DE, Wajchenberg M, et al. Subclinical *Propionibacterium acnes* infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort. *BMJ Open* 2017;7:e017930. doi:10.1136/bmjopen-2017-017930

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017930).

Received 25 May 2017

Revised 23 August 2017

Accepted 28 September 2017



CrossMark

¹Programa Locomotor, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

²Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

³Serviço de Microbiologia do Laboratório Clínico, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

⁴Departamento de Diagnóstico por Imagem, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to:

Nelson Astur;
nelson.astur@einstein.br

ABSTRACT

Introduction Low back pain and vertebral endplate abnormalities are common conditions within the population. Subclinical infection caused by indolent pathogens can potentially lead to these findings, with differentiation between them notably challenging from a clinical perspective. Progressive infection of the intervertebral disc has been extensively associated with increasing low back pain, with *Propionibacterium acnes* specifically implicated with in relation to sciatica. The main purpose of this study is to identify if the presence of an infective pathogen within the intervertebral disc is primary or is a result of intraoperative contamination, and whether this correlates to low back pain.

Methods and analysis An open prospective cohort study will be performed. Subjects included within the study will be between the ages of 18 and 65 years and have a diagnosis of lumbar disc herniation requiring open decompression surgery. Excised herniated disc fragments, muscle and ligamentum flavum samples will be collected during surgery and sent to microbiology for tissue culture and pathogen identification. Score questionnaires for pain, functionality and quality of life will be given preoperatively and at 1, 3, 6 and 12 months postoperatively. A MRI will be performed 12 months after surgery for analysis of Modic changes and baseline comparison. The primary endpoint is the rate of disc infection in patients with symptomatic degenerative disc disease. The secondary endpoints will be performance scores, Modic incidence and volume.

Ethics and dissemination This study was approved by our Institutional Review Board and was only initiated after it (CAAE 65102617.2.0000.0071). Patients agreeing to participate will sign an informed consent form before entering the study. Results will be published in a peer reviewed medical journal irrespective of study findings. If shown to be the case, this would have profound effects on the way physicians treat chronic low back pain, even impacting health costs.

Trials registration number NCT0315876; Pre-results.

INTRODUCTION

Low back pain and vertebral endplate abnormalities are common conditions within the population, with Modic *et al*^{1,2} reporting endplate abnormality rates of up to 6% within the population and 46% of patients complaining of low back pain.³ Modic type I changes are described as vertebral bone marrow oedema related to acute low back pain.⁴ When Modic changes are detected, there is a 4.5-times higher incidence of non-specific low back pain on presentation.^{1,2}

Subclinical infection caused by low-virulence pathogens can potentially lead to vertebral endplate abnormalities, which are identified through MRI. Differentiation between subclinical infection and Modic changes may be notably difficult, given the paucity of examination findings.^{5,6} Additionally, subclinical infections can be associated with increasing low back pain.⁷ Albert *et al*⁸ reported 61 patients who had undergone surgical treatment for lumbar disc herniation, with 46% of cases showing a positive culture. The same authors also reported that 80% of the patients with a positive culture for anaerobic pathogens presented with Modic type I changes at the adjacent vertebra after a 2-year follow-up. This is in stark contrast to only 44% of patients with negative culture. Some studies demonstrated the presence of low-virulence pathogens in intervertebral disc tissue cultures,^{9–10} with the most common causative organism reported as *Propionibacterium acnes*.

Chronic low back pain and Modic type I changes have been treated with antibiotics for up to 100 days with superior outcomes in comparison with placebo treatment according to Albert *et al*.⁷ In this study, patients were treated with amoxicillin/clavulanate

Open Access



(500 mg/125 mg)⁷ following another study where *P. acnes* was linked to sciatica.⁸ However, Carricajo *et al.*¹¹ suggest that the presence of *P. acnes* in the intervertebral discs is due to either external surgical or laboratory contamination. Within their study, they detected positive disc cultures in only 3.7% of 54 patients. Further, the same group demonstrated that samples of spinal muscle and ligamentum *flavum* had positive cultures in 14.8% of cases that had negative disc cultures. Reinforcing the findings of this study, Rigal *et al.*¹² analysed a sample of 313 patients undergoing video-assisted or retroperitoneal anterior approach, and found only 6 cases of positive cultures. No correlation between infection and degeneration of the intervertebral disc was found. Contrastingly, Rollason *et al.*¹³ in a study of genotype characterisation, observed that *P. acnes* cultured from disc samples surgically resected from 64 patients with disc herniation were different from those normally colonising the skin, suggesting that this variant of the *P. acnes* bacterium could be related to low back pain. A systematic review performed by Urquhart *et al.*¹⁴ concluded that there is moderate evidence of a relationship between positive *P. acnes* cultures with Modic type I changes and low back pain, although the evidence was not substantive. The group concluded that new studies should be conducted to determine whether pathogens within the vertebral disc arise from external contamination or if they are truly implicated in the development of chronic back pain (low back pain for at least 3 months).

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

We hypothesise that lumbar disc herniation is related to subclinical infection of the intervertebral disc.

Our primary endpoint of this study is to identify whether the presence of a pathogen within the intervertebral disc is primary or if it is a result of intraoperative contamination.

The secondary endpoints are to analyse clinical prognostic factors in patients and the diagnosis of infection. The study also proposes to analyse the relationship between radiological changes (Modic I and II) and infection.

JUSTIFICATION AND SCIENTIFIC CHALLENGES

If there is a confirmation of a relationship between subclinical pathogens, lumbar disc herniation and Modic changes with non-specific chronic back pain, this will change the way this disease process is managed and improve treatment costs and patient outcomes.

Previously published studies that report a strong correlation between *P. acnes* and low back pain and/or disc herniation are almost entirely from the same study group.^{5–8} Few studies have questioned their results and those that have only presented small sample groups and inadequate statistical methodologies.¹¹ For this prospective cohort study, we previously calculated the minimum number of subjects needed for adequate statistical

analysis. Aside from outlining a specific culturing method for *P. acnes*, this project addresses molecular analysis and clinical outcomes follow-up in a single study. This provides a complexity and significance that have not been achieved in previously published studies on the topic.

METHODS AND ANALYSIS

This study protocol is registered at *Clinicaltrials.gov* under NCT0315876 (Pre-results) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03158766?term=NCT03158766&rank=1>).

Study design

An open prospective cohort study will be performed at a single centre, (Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE)) taking 1 year for recruiting, and ending 1 year after inclusion of last patient. Patients' data will be collected with a specific form created for this study. Patients will be summoned for a new MRI of the lumbar spine 1 year after their surgical procedure.

All included patients will go through further treatment of 10 sessions of postoperative physical therapy. They will be instructed to maintain learnt exercises in their residences. Pain medications will not be controlled and will follow attending physician prescriptions.

Population

Patients will be consecutively included in the study.

Inclusion criteria

Inclusion criteria were as follows: subjects between 18 and 65 years of age; both genders; diagnosis of lumbar disc herniation and are undergoing open decompression surgery (microdiscectomy). Indication for surgery is sciatica caused by disc herniation compression of a lumbar nerve root failing conservative treatment for at least 6 weeks or ongoing neurological deficit. Patients with a history of previous spinal injection will not be excluded from the study. Patients willing and able to go through all phases of clinical investigation will be included. An informed consent form (ICF) must be signed.

Exclusion criteria

Exclusion criteria were as follows: patients with previous lumbar disc surgery at the same level at any point of life; patients undergoing chemotherapy; patients with any immune deficiency; patients previously submitted to disc injection and/or discography; patients submitted to previous endoscopic disc surgery; patients with fusion performed at the same stage of decompression surgery; patients with any other infection within the last 6 months or usage of antibiotics within the last 2 months; patients with incomplete specific form or data; and decline to participate or sign the ICF.

Patient enrolment in the study

Evaluation of patient eligibility will be carried out by the main investigator or by a coinvestigator. Both study coordinators will perform an interview with a candidate

patient about his/her willingness to participate in the study. They will be responsible for confirming their eligibility in relation to the inclusion and exclusion criteria; and, if the patient accepts, the investigator will explain all study details and read along the ICF. Any questions regarding the objectives of the study, involved procedures, risks/benefits and confidentiality will be resolved. Patients accepting to participation will date and sign the ICF. A copy of the form will be attached to the patient's medical record, and another will be provided to the patients themselves. After the ICF is properly signed, the patient will undergo an interview to complete the initial demographic data and pretreatment forms. If the patient is unable to sign the written ICF, the investigator will vocally explain the study and the patient will provide oral consent in the presence of a witness that will sign the ICF. Patient recruitment will be carried out for 24 months, so that 95 patients shall be included (details of estimated *n* reported at sample size determination).

Patient allocation

Patients will undergo surgery according to surgeons' preference. Attending surgeons will determine chosen operative technique according to their experience and preference.

Blinding

Neither the patient or attending physician will have access to the results of tissue cultures. The radiologist who will analyse the imaging studies of performed MRIs will also be blinded to the patient data and laboratory results. A blinded investigator will analyse pain and function scores.

Early stopping of participation in the study

Patients will be excluded from the study on:

- ▶ Withdrawal of ICF.
- ▶ Death.
- ▶ Patient selection flaw identified (incompatible eligibility criteria).
- ▶ Lost to follow-up.
- ▶ Patient presents with clinical symptoms of infection, inclusive of severe lumbar or radicular pain, fever with no other detected foci, abnormal erythrocyte sedimentation rate (ESR)/C-reactive protein (CRP)/leucogram, altered imaging studies that lead to interruption of the blinding of the results of culture exams.

For each excluded case, the reason and circumstance for the withdrawal will be detailed. Patient data collected until that point of the study will be included at final analysis.

Selected endpoints

Primary endpoint

Rate of intervertebral disc infection

The primary objective of this study was to consider the incidence of intervertebral disc infection by any type of low virulence pathogen, with consequent Modic changes and chronic low back pain. Thus, the calculation of the

incidence of infection in lumbar disc herniations will be performed.

1. Incidence of infection rate (IIR) will be calculated as follows:

$$\text{IIR} = \frac{(\text{number of detected infections})}{(\text{total number of included patients})}$$

Secondary endpoint

Low back pain

Intensity of low back pain and limitation for daily activities of patients with and without infection will be analysed through the numeric rating score (NRS) system applied at time of patient recruitment and 1, 3, 6 and 12 months after surgical procedure (table 1). The clinically significant threshold will be considered to be an increase of 30% of baseline lumbar pain at the first postoperative month. NRS and the visual analogue scale (VAS) have good correlation and are equally sensitive to quantify postoperative pain.¹⁵ Compared with VAS, NRS is easier to manage and codify; furthermore, less mistakes occur during data insertion.¹⁶ Otherwise, it is easier to complete¹⁶ and preferred by patients.¹⁷

Quality of life

Quality of life at the end of 1 year for both infected and uninfected groups, with and without Modic changes, will be analysed through the validated Portuguese version of the EuroQol (EQ-5D) questionnaire. This measurement tool will be applied at timing of patient recruitment, and 1, 3, 6 and 12 months after surgery.

EQ-5D is a self-completing standardised tool containing five items (mobility, self-care, usual activities, pain/discomfort and anxiety/depression). Compared with the Short-Form 36 (SF-36) questionnaire, EQ-5D is a shorter and faster form to analyse.

Function

Function will be quantified through the Portuguese version of the Oswestry Disability Index (ODI) for lumbar pain that will be applied at time of recruitment and 1, 3, 6 and 12 months after surgery.

Modic incidence

Insurgent Modic changes in patients will be analysed 1 year after surgery, as well as its relationship with the presence or the absence of infection.

Incidence of Modic (IM) changes will be calculated for the infection group (IM infec) and for the total group (IM total) as follows:

$$\text{IM infec} = \frac{(\text{number of Modic changes in infected patients after 1 year})}{(\text{total number of infections})}$$

$$\text{IM total} = \frac{(\text{number of Modic changes at final 1 year follow-up})}{(\text{total number of patients})}$$

Volume and size of Modic changes: additional imaging analysis

Quantification of sizing will be done by two radiologists with expertise in musculoskeletal diagnosis. All images will be analysed in sagittal T1-weighted, T2-weighted

Table 1 Chronogram of included patients

	Screening/ Recruiting	Postop 4 weeks $\pm$ 7 days	Postop 3 months $\pm$ 14 days	Postop 6 months $\pm$ 21 days	Postop 12 months $\pm$ 30 days
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5
ICF	X				
Check including and excluding criteria	X				
Collect demographic data	X				
Investigate medical history/ complete enrolment form	X				
Lab screening, ESR, CRP, leucogram	X	X		X	X
Apply NRS tool	X	X	X	X	X
Apply Oswestry questionnaire	X	X	X	X	X
Apply EQ-5D questionnaire	X	X	X	X	X
Physical therapy		X			
MRI					X

CRP, C-reactive protein; EQ-5D, European quality of life five dimensions; ESR, erythrocyte sedimentation rate; ICF, informed consent form; NRS, numeric rating scale; Postop, postoperative.

and FAT-T2-weighted sequences of the lumbar spine in the DICOM format. Modic volume will be measured according to Wang *et al.*¹⁸ Three sagittal slices of the lumbar spine will be considered: midsagittal slice; left pedicle parasagittal slice and right pedicle parasagittal slice. The parameters examined to quantify Modic changes will include measures of ratios of the region affected by Modic changes to the entire corresponding vertebral body, including maximal width ratio, maximal height ratio and area ratio. Vertebral body changes will be classified accordingly to Modic changes type I, II and III.^{1,2} Soft tissues around the vertebra, such as disc, muscles and ligaments, will also be analysed. Data will be collected for the presence of vertebral or disc oedema, and the presence of disc hydration or not. Disc degeneration will be collected as: normal; degeneration with height preservation and degeneration with loss of height. Preoperative and 12-month postoperative-acquired MRI studies will be compared. Both superior and inferior disc endplates will be evaluated and compared. Preoperative study will be taken as baseline for comparative purposes.

Adverse effects

Fail of surgical treatment (recurrence, instability, need for reoperation and so on), need for additional physical therapy sessions, superficial infection, drainage, deep venous thrombosis and any other possible adverse event that may show up will be included as well.

Study stages

Sample collection

Included patients will undergo standard fashion general anaesthesia and prepped with chlorhexidine solution. Intravenous antibiotic prophylaxis will be administered within first hour before skin incision, according to the

standard protocol of HIAE Infection Control Committee published at the hospital Pharmaceutics Manual.

Preoperative blood sample will be collected for leucogram, ESR and CRP. Same laboratory tests will be repeated at 1, 6 and 12 months time point (table 1).

The excised herniated disc fragment will be immediately sent to microbiology laboratory analysis in a universal sterile container (screw cap tube) in no >30 min to be processed as follows. The same process will be applied to samples of deep muscle and ligamentum flavum at the end of the surgical procedure. Three cultures of the intervertebral disc will be done, as well as three of the ligamentum flavum and three of the multifidus muscle for each patient. The flowchart of this stage is described in figure 1. Search for pathogens protocol is similar to the one proposed by Levy *et al.*¹⁹ although due to the avascular nature of the intervertebral disc, we will inoculate the sonication fluid (after sample concentration) in blood cultures bottles (automated system) to improve the recovery of pathogens and reduce contamination.

Search for pathogens

The herniated intervertebral disc will be split equally into three fragments of 2 $\times$ 2 $\times$ 5 mm and flattened in a laminar flow cabinet until a homogeneous material is achieved. The same process will be carried out for the samples of ligamentum flavum and multifidus. Tissues will be cultured in specific growth medium and incubated according to the respective culture:

Similar criteria used by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) to detect joint replacement infection will be adopted, which is the recommendation on at least two positive tissue cultures by the same pathogen to confirm diagnosis of infection.²⁰ This same criterion was

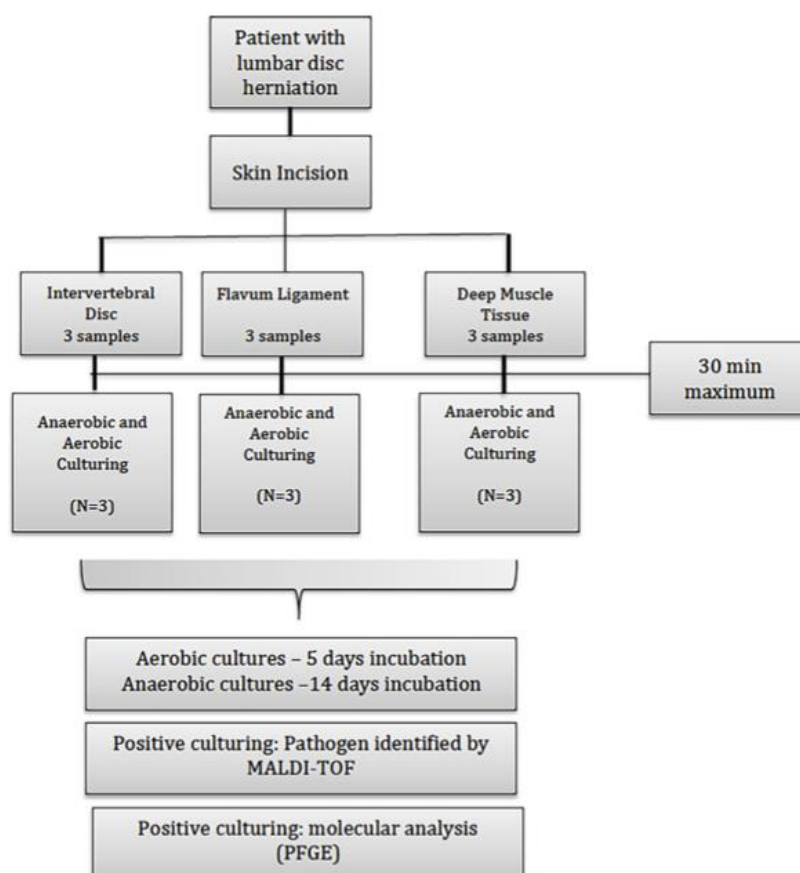


Figure 1 Flowchart of collected clinical samples that will be sent to culture analysis. MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight; PFGE, pulsed field gel electrophoresis.

already adopted in a study to characterise isolated pathogens in herniated intervertebral discs.¹⁴

A: aerobic culture

For aerobic cultures, samples will be cultured in 5% sheep blood agar, chocolate agar and MacConkey agar plate, and will be placed in a 35°C incubator (CO₂ atmosphere) for 5 days. If a positive bacteria culture is detected in the plate, the colony will be identified by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight) Microflex LT (Bruker Daltonics/BD). Sensitivity profile will be performed when needed, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations.

B: anaerobic culture

For anaerobic culture, tissue will be cultured in a Thioglycolate tube and incubated in an incubator at 35°C for up to 14 days. If turbidity occurs at the Thioglycolate medium, material will be cultured in anaerobic blood agar and incubation at 35°C will be done in an anaerobic

atmosphere. After growing of colonies, identification will be done by MALDI-TOF and, when necessary, a sensitivity test to antibiotics will be performed according to CLSI recommendations.

C: histological analysis

Anatomic pathology analysis of the remaining fragment of the herniated disc (2×2×5 mm) will be completed. The sample will be transported in a universal container with tamponated formalin (10%), followed by dehydration in alcohol diafanized in xylol and inclusion in paraffin (60°C–65°C), which will be stained in H&E and Gram staining solutions.

H&E: histological cuts of 4µm will be performed, followed by clearing with xylol for 10 min twice, embedding with alcohol under increasing concentrations and stained with haematoxylin for 5 min, running water for 5 min, eosin for 1 min and running water for 2 min followed by assembly of a glass microscope slide with Entellan.

Gram: another slide will be embedded with crystal violet for 1 min, running water for 1 min followed by lugol for another 1 min and additional wash with running water. Unstaining of the slide will be done with alcohol 95% for 10 s followed by running water and then, stain with fuchsin for 30 s, running water wash again, drying and slide assembly with Entellan.

D: molecular analysis of pathogens

Positive cultures that present aerobic or anaerobic pathogens culturing, will be isolated and stored refrigerated in -80°C freezer for posterior molecular analysis.

Molecular typing will be performed through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique of isolated samples according to the protocol described by Oprica *et al*²¹ using Spe-I restriction enzyme and Bionumerics software for analysis of results.

Questionnaires

Scores for pain (NRS), function (ODI) and quality of life (EQ-5D) will be self-assessed and applied before surgery and at 1, 3, 6 and 12 months time points. All questionnaires will be collected by a employee not involved in the study. Follow-up clinic visits will be at 1, 3, 6 and 12 months after surgical procedure, with acceptance deviation of 7, 14, 21 and 28 days, respectively (table 1).

Imaging studies

MRI studies will be performed in Siemens or General Electric 1.5T devices. Studies in 3.0T devices will not be done due to higher frequency of artefacts generated by chemical shift, which would modify measurements of Modic changes.

The following sequences will be used:

- ▶ Sagittal cut: fast Spin-Echo T1-weighted and T2-weighted sequences with fat suppression or short tau inversion recovery (STIR) instead of T2, according to our institution protocol established for all examinations.
- ▶ Coronal cut: same sequence imaging will be used for measurements.

At follow-up, contrasted MRI studies of patients will be done as an institution established protocol for postoperative patients, otherwise, it will not interfere with the study protocol.

Lumbar disc herniation will be diagnosed through MRI in eligible patients. Included patients will be submitted to new MRI 12 months after surgery.

Two radiologists with expertise in musculoskeletal MRI will independently classify and perform measurements, and divergences will be solved blindly by common opinion.

Confounding variables

Data on the following confounding variables will be collected: age, gender, alcohol intake, smoking, body mass index (BMI), spinal injections with corticoid within 6 months before surgery, usage of oral corticoids up to 3 months before surgery and diabetes.

As this information may change over time, data will be considered at time of last assessment before surgery.

A: alcohol intake

It is categorised as follows: none or sporadically (<1 glass/day); light intake (1–2 glass/day); moderate/heavy intake (3 or more glasses/day) and not assessed.²²

B: smoking

It is categorised as follows: ex-smokers; smoker; non-smoker and not assessed.²³

C: BMI

It is categorised as follows: underweight (<18.5); normal weight (18.5–25); overweight (25–30); obese (>30) and not assessed or not available.²⁴

ETHICS AND DISSEMINATION

Some authors suggest that subclinical infection of the intervertebral disc is one of the causes of chronic low back pain unresponsive to treatment, besides promoting Modic type I changes on MRI. Although there are studies reporting relative success on treatment of well-selected patients, there is still uncertainty as to whether these patients were actually infected or not.

We hope to define the accurate incidence of subclinical infection of the intervertebral disc with disc herniation and provide data and possibly an answer to this present gap in the literature.

STATISTICAL PLANNING

Rate of subclinical infection (or Modic change) will be obtained by the ratio between number of positive cultures from surgical samples and total number of patients, and estimates will follow 95% CIs. After infection cases are identified, we will investigate if there is an association between detected infection and patient outcomes by logistic regression models for Modic changes, ordinal logistic regression for Modic volume and size, and linear regression or general linear models for numeric outcomes, such as low back pain, quality of life and function. All models will consider confounding variables such as smoking and alcohol intake, diabetes, corticosteroids injection, BMI, gender and age. Results will be presented as effects estimates such as OR or mean ratio, 95% CIs and P values. Study dropout cases, for any reason, will be considered for final analysis.

Sample size calculation

Sample size was calculated to estimate the incidence of subclinical infection in patients with lumbar disc herniation. Considering that the rate of infection lies around 46%,⁵ we need to observe a minimum of 95 patients to achieve a 95% CI with 10% absolute accuracy.

The necessary sample size required for analysis of the secondary endpoints will depend on the observed rate of cases with subclinical infection in our study sample. If the



observed rate is too small, then an increase in the number of included patients will be needed. To better evaluate this, the sample size calculation will be revisited by the time we have reached half of initially planned sample size (48 patients).

Contributors NA: conception and design of the work, data collection, data analysis and interpretation, and drafting the article. DEM: conception and design of the work, data collection, data analysis and interpretation, critical revision of the article and final approval of the version to be published. MW: data collection, critical revision of the article and final approval of the version to be published. MF: critical revision of the article and final approval of the version to be published. FGM: conception and design of the work and final approval of the version to be published. AMD: conception and design of the work, data collection, data analysis and interpretation. LAR and DCBS: design of the work, data analysis and interpretation, and data collection. ASY, LMRR, MDVM and JRP: data collection and critical revision of the article. ENKF: design of the work and data analysis. ML: conception of the work, critical revision of the article and final approval of the version to be published.

Funding This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant number 2016/15830-7).

Competing interests None declared.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Ethics Committee of Hospital Israelita Albert Einstein.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open Access This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

© Article author(s) (or their employer(s) unless otherwise stated in the text of the article) 2017. All rights reserved. No commercial use is permitted unless otherwise expressly granted.

REFERENCES

- Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, *et al.* Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology* 1988;166:193-9.
- Modic MT, Masaryk TJ, Ross JS. Imaging of degenerative disk disease. *Radiology* 1988;168:177-86.
- Jensen TS, Karpinen J, Sorensen JS, *et al.* Vertebral endplate signal changes (Modic change): a systematic literature review of prevalence and association with non-specific low back pain. *Eur Spine J* 2008;17:1407-22.
- Toyone T, Takahashi K, Kitahara H, *et al.* Vertebral bone-marrow changes in degenerative lumbar disc disease. An MRI study of 74 patients with low back pain. *J Bone Joint Surg Br* 1994;76:757-64.
- Albert HB, Kjaer P, Jensen TS, *et al.* Modic changes, possible causes and relation to low back pain. *Med Hypotheses* 2008;70:361-8.
- Ohtori S, Koshi T, Yamashita M, *et al.* Existence of pyogenic spondylitis in Modic type 1 change without other signs of infection: 2-year follow-up. *Eur Spine J* 2010;19:1200-5.
- Albert HB, Sorensen JS, Christensen BS, *et al.* Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy. *Eur Spine J* 2013;22:691-707.
- Albert HB, Lambert P, Rollason J, *et al.* Does nuclear tissue infected with bacteria following disc herniations lead to Modic changes in the adjacent vertebrae? *Eur Spine J* 2013;22:690-6.
- Stirling A, Worthington T, Rafiq M, *et al.* Association between sciatica and Propionibacterium acnes. *Lancet* 2001;357:2024-5.
- Agarwal V, Golish SR, Alamin TF. Bacteriologic culture of excised intervertebral disc from immunocompetent patients undergoing single level primary lumbar microdiscectomy. *J Spinal Disord Tech* 2011;24:397-400.
- Carricajo A, Nuti C, Aubert E, *et al.* Propionibacterium acnes contamination in lumbar disc surgery. *J Hosp Infect* 2007;66:275-7.
- Rigal J, Thelen T, Byrne F, *et al.* Prospective study using anterior approach did not show association between Modic 1 changes and low grade infection in lumbar spine. *Eur Spine J* 2016;25:1000-5.
- Rollason J, McDowell A, Albert HB, *et al.* Genotypic and antimicrobial characterisation of Propionibacterium acnes isolates from surgically excised lumbar disc herniations. *Biomed Res Int* 2013;2013:1-7.
- Urquhart DM, Zheng Y, Cheng AC, *et al.* Could low grade bacterial infection contribute to low back pain? A systematic review. *BMC Med* 2015;13:13.
- Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM, *et al.* Assessment of pain. *Br J Anaesth* 2008;101:17-24.
- Ritter PL, González VM, Laurent DD, *et al.* Measurement of pain using the visual numeric scale. *J Rheumatol* 2006;33:574-80.
- Gagliese L, Weizblit N, Ellis W, *et al.* The measurement of postoperative pain: a comparison of intensity scales in younger and older surgical patients. *Pain* 2005;117:412-20.
- Wang Y, Videman T, Niemeläinen R, *et al.* Quantitative measures of modic changes in lumbar spine magnetic resonance imaging: intra- and inter-rater reliability. *Spine* 2011;36:1236-43.
- Levy O, Iyer S, Atoun E, *et al.* Propionibacterium acnes: an underestimated etiology in the pathogenesis of osteoarthritis? *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:505-11.
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, *et al.* Executive summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56:1-10.
- Oprica C, Emtestam L, Lapins J, *et al.* Antibiotic-resistant Propionibacterium acnes on the skin of patients with moderate to severe acne in Stockholm. *Anaerobe* 2004;10:155-64.
- Alcohol drinking. IARC Working Group, Lyon, 13-20 October 1987. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans*;1988:1-378.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans* 2004;83:1-1438.
- Reeves GK, Pirie K, Beral V, *et al.* Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 2007;335:1134.



Subclinical *Propionibacterium acnes* infection estimation in the intervertebral disc (SPInE-ID): protocol for a prospective cohort

Nelson Astur, Delio E Martins, Marcelo Wajchenberg, Mario Ferretti, Fernando G Menezes, Andre M Doi, Laercio A Rosemberg, Durval C B Santos, Alexandre S Iutaka, Luciano M R Rodrigues, Marines D V Martino, Jorge R Pagura, Eduardo N Kihara Filho and Mario Lenza

BMJ Open 2017 7:

doi: 10.1136/bmjopen-2017-017930

Updated information and services can be found at:
<http://bmjopen.bmj.com/content/7/11/e017930>

These include:

References

This article cites 22 articles, 2 of which you can access for free at:
<http://bmjopen.bmj.com/content/7/11/e017930#BIBL>

Open Access

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections
[Surgery](#) (420)

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

Apêndice 2. Artigo com resultados publicado no *The Spine Journal* em 2022 (Fator de Impacto: 4,166 [2023])



The SPINE
JOURNAL

The Spine Journal 22 (2022) 389–398

Clinical Study

Next-generation sequencing (NGS) to determine microbiome of herniated intervertebral disc

Nelson Astur, MD, MSc^{a,*}, Brenno Ferreira Bento Maciel, BS^b,
Andre Mario Doi, MD, PhD^{b,c}, Marines Dalla Valle Martino, MD, PhD^{b,c},
Marcela Souza Basqueira, BSB, PhD^c, Marcelo Wajchenberg, MD, PhD^a,
Mario Lenza, MD, PhD^{a,b}, Delio Eulalio Martins, MD, PhD^a

^a Programa Locomotor, Hospital Israelita Albert Einstein, Av Albert Einstein 627, Sao Paulo, SP, Brazil, 05652-900

^b Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, Av Prof. Francisco Morato 4293, Sao Paulo, SP, Brazil, 05521-200

^c Serviço de Microbiologia do Laboratório Clínico, Hospital Israelita Albert Einstein, Av Albert Einstein 627, Sao Paulo, SP, Brazil, 05652-900

Received 27 April 2021; revised 6 September 2021; accepted 14 September 2021

Abstract

BACKGROUND CONTEXT: There is apparent causality between chronic infection of the intervertebral disc and its degenerative process. Although disc is considered a sterile tissue, collected samples of uninfected patients sent to culture testing resulted positive.

PURPOSE: The purpose of this study was to analyze the microbiome of the intervertebral disc by using and validating the next-generation sequencing (NGS) molecular test, controlled with tissue culture and clinical presentation of patients.

STUDY DESIGN/SETTING: Prospective study of consecutive patients in a hospital.

PATIENT SAMPLE: Patients with lumbar disc herniation undergoing open microdiscectomy aging 18 to 65 years.

OUTCOME MEASURES: NGS, tissue culture

METHODS: Subjects undergoing open decompression surgery for lumbar disc herniation were consecutively included and clinically followed for one year. Three samples of the excised herniated disc fragment were sent to tissue culture and another sample of the disc was sent to NGS test for microbiome analysis. Control samples of the ligamentum flavum and deep muscle were collected and sent to culture.

RESULTS: A total of 17 patients were included. All patients presented negative cultures of the removed disc samples, as well as negative cultures of muscle and yellow ligament. None of the patients evolved to clinical infection one year after surgery, nor presented significant alteration of laboratory markers. NGS mapped a mean of 14,645 (range 6,540 to 27,176) DNA sequences for each disc sample of each patient. There were a total of 45 different bacteria genera remnants with different amount of DNA sequences detected. There was a mean of 8 (range 3–17) different bacterial elements in each sample of intervertebral disc. Three bacteria were present in all disc samples (*Herbaspirillum*, *Ralstonia*, and *Burkholderia*). Although there were a considerable mean number of bacterial sequences mapped in each disc sample, the amount of sequences related to bacteria was low. *Cutibacterium acnes* elements was not found in any disc microbiome analysis.

CONCLUSIONS: NGS has been proven to adequately determine bacterial DNA presence within the intervertebral disc. *C. acnes* was not isolated in culture neither in microbiome analysis of patients with lumbar disc herniation. We cannot confirm disc sterility since, even if it does not cause infection, there is bacterial or remnant DNA in herniated discs. © 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Degeneration; Intervertebral Disc; Infection; Lumbar Spine; Microbiome; Next-generation sequencing; Tissue Culture

FDA device/drug status: Not applicable.

Author disclosures: **NA:** Nothing to disclose. **BFBM:** Nothing to disclose. **AMD:** Nothing to disclose. **MDVM:** Nothing to disclose. **MSB:** Nothing to disclose. **MW:** Nothing to disclose. **ML:** Nothing to disclose. **DEM:** Nothing to disclose.

*Corresponding author. Hospital Israelita Albert Einstein, Av Albert Einstein 627, Sao Paulo, SP, Brazil, 05652-900.

E-mail address: nelson.astur@einstein.br (N. Astur).

<https://doi.org/10.1016/j.spinee.2021.09.005>
1529-9430/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.