



Disbiose supragengival e o risco de doenças orais em pacientes  
colonizados por *Staphylococcus aureus*

Etyene Schnurr

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre Medicina Dentária

Gandra, 27 de junho de 2019

## Declaração de Integridade

Eu, Etyene Schnurr, estudante do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste Relatório de Estágio intitulado: "Disbiose supragengival e o risco de doenças orais em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*".

Confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele).

Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Relatório apresentado no Instituto Universitário de Ciências da Saúde

Orientador: Professora Doutora Cristina Maria Leal Moreira Coelho

## DECLARAÇÃO

Eu Cristina Maria Leal Moreira Coelho, com a categoria de professor auxiliar do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, tendo assumido o papel de Orientador do Relatório Final de Estágio intitulado "Disbiose supragengival e o risco de doenças orais em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*." da aluna de Mestrado Integrado em Medicina Dentária, Etyene Schnurr, declaro que sou de parecer favorável para que o Relatório Final de Estágio possa ser presente ao Juri para a Admissão e provas conducentes à obtenção do Grau de Mestre.

Gandra, de      de 2019.

---

O Orientador

Professora Doutora Cristina Maria Leal Moreira Coelho

## Agradecimentos

À minha família, meu amor, Udo Schnurr.

Aos meus Theo, Rubens, Cely, Etyel, Flávia, João, Karl e Rita.

Ao Triathlon.

À São Jose.

Às riquezas maiores: meus amigos e minhas amigas.

Ao doce e entusiasmante encontro com a minha Orientadora, Prof. Dr. Cristina Maria Leal Moreira Coelho.

## Resumo

**Introdução:** O biofilme é um componente essencial no desenvolvimento da cárie, das doenças periodontais e peri-implantares. O conhecimento da sua composição e a compreensão das interações microbianas presentes no biofilme oral são fundamentais para a conceção de medidas preventivas e terapêuticas eficazes.

**Objetivo:** Investigar se a presença de *Staphylococcus aureus* favorece uma mudança na composição do biofilme supragengival *in vitro*.

**Materiais e métodos:** Neste estudo foi utilizado um modelo padrão de biofilme supragengival com seis espécies (*Actinomyces oris*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans*). O biofilme foi suplementado com isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (linhagem USA300 do tipo selvagem) e *Staphylococcus aureus* contendo mutações em genes que codificam para proteínas adesivas da superfície da matriz.

**Resultados:** As estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) aumentaram o número de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella dispar* no biofilme supragengival. A estirpe mutante de *Staphylococcus aureus*, onde deletamos os genes que codificam as proteínas de adesão bacteriana, reduziu o crescimento dessas espécies para um nível normal e homeostático.

**Conclusão:** A espécie *Staphylococcus aureus* na cavidade oral, por si só, pode não causar periodontite nem peri-implantite, mas promove a disbiose do biofilme, onde microrganismos potencialmente patogénicos, normalmente em baixa quantidade, se tornam predominantes. A co-presença de componentes no ambiente bucal, tais como proteínas/citocinas na saliva, microrganismos transitórios ou biomateriais, podem contribuir para a patogénese da doença e serem determinantes na etiologia multifatorial das doenças orais. Os resultados da mudança da composição do biofilme supragengival *in vitro* produzidas por estirpes de *Staphylococcus aureus*, sugerem que indivíduos portadores deste microrganismo na cavidade oral, podem apresentar uma maior suscetibilidade a doenças orais.

**Palavras chave:** "Biofilme oral"; "Disbiose"; "*Staphylococcus aureus*"; "Periodontite"; "Peri-implantite."

## Abstract

**Introduction:** Biofilm is an essential component involved in the development of caries, periodontal and peri-implant diseases, and hence knowledge of its composition and understanding of inter-microbial interactions are fundamental for designing effective preventive and therapeutic measures.

**Objective:** To investigate whether the presence of *Staphylococcus aureus* favors a change in the composition of the supragingival biofilm *in vitro*.

**Material and Methods:** The standard 6-species "supragingival" (*Actinomyces oris*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Candida albicans*) biofilm model was used in this study. The biofilm was supplemented with *Staphylococcus aureus* clinical isolates, *Staphylococcus aureus* (USA300 wild-type strain) or *Staphylococcus aureus* mutants strains containing inframe deletions of surface adhesines proteins.

**Results:** A *Staphylococcus aureus* that carries resistance to meticilin MRSA increased the number of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella dispar* in the supragingival biofilm. We tested a *Staphylococcus aureus* mutant strain, which had deleted the genes coding for the bacterial-binding proteins, and under this condition, the growth of these species were reduced to a normal and homeostatic level.

**Conclusions:** *Staphylococcus aureus* by itself may not cause periodontitis or peri-implantitis, however it promotes biofilm dysbiosis, where potentially pathogenic organisms, normally in low abundance, become predominant. The co-presence of other components in the oral environment, such as proteins/cytokines in saliva, transient microbials or biomaterials, may contribute to disease pathogenesis and date the multifactorial etiology of oral diseases. The results of the change in the composition of the supragingival biofilm *in vitro* produced by strains of *Staphylococcus aureus* suggest that individuals carrying this microorganism in the oral cavity may be more susceptible to oral diseases.

**Key words:** "Oral biofilm"; "Dysbiosis"; "*Staphylococcus aureus*"; "Periodontitis"; "Peri-implantitis."

## Lista de Abreviaturas e Siglas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à metilina

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

CA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade

MLST ou ST – sequência multilocus

SCC – cromossoma cassete tipo mec

LukF-PVL – gene F da leucocidina panton-Valentine

SF8300\_USA300 – Estirpe selvagem de *Staphylococcus aureus*

MSCRAMMs – Moléculas adesivas de superfície e matriz

$\Delta$ MSCRAMMs – *Staphylococcus aureus* mutante para as moléculas adesivas de superfície de matriz

clfA, clfB – Clumping factor A, clumping factor B

sdrC, sdrD, sdrE – serina-aspartato proteínas de repetição C, D, E

fnBPA e fnBPB – Fibronectina A, fibronectina B

UFCs – Unidades formadoras de colónias

CLSM – Microscopia confocal de varredura a laser

## Índice Geral

### Capítulo I

Disbiose supragengival e o risco de doenças orais em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*

1.	Introdução .....	11
2.	Objetivo .....	12
3.	Material e Métodos .....	13
4.	Resultados/Discussão.....	16
5.	Conclusão .....	22
6.	Bibliografia.....	24

### Capítulo II

	Relatório dos Estágios.....	29
1.	Estágio em Clínica Hospitalar .....	29
2.	Estágio em Clínica Geral Dentária .....	29
3.	Estágio em Saúde Oral e Comunitária.....	30



## Índice de Tabelas

Tabela 1- Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas neste estudo.....	13
Tabela 2- Biofilme supragengival suplementado com estirpes de MRSA e MSSA.....	18
Tabela 3- Biofilme supragengival suplementado com SF8300_USA300 ou $\Delta$ MSCRAMMs.....	19
Tabela 4. Número de atos clínicos realizados como operador e assistente em todo o percurso no Estágio em Clínica Hospitalar.....	29
Tabela 5. Número de atos clínicos realizados como operadora e assistente em todo o percurso no Estágio em Clínica Geral Dentária.....	29
Tabela 6. Número de atos clínicos realizados como operadora e assistente em todo o percurso no Estágio em Saúde Oral Comunitária.....	30

## Índice de Figuras

Figura 1- Análise da composição quantitativa dos biofilmes multiespécies bucais suplementado com estirpes de MRSA e MSSA .....	17
Figura 2- Análise da composição quantitativa dos biofilmes multiespécies bucais suplementado com SF8300_USA300 ou $\Delta$ MSCRAMMs .....	19
Figura 3- Localização de <i>Streptococcus oralis</i> e <i>Streptococcus mutans</i> nos biofilmes.....	21
Figura 4- Localização de <i>Streptococcus oralis</i> e <i>Streptococcus mutans</i> nos biofilmes com a adição da estirpe mutante, $\Delta$ MSCRAMMs.....	22
Figura 5: As 10 intervenções. Descrição dos procedimentos que definem cada uma das dez intervenções.....	31

## Capítulo I – Disbiose supragengival e o risco de doenças orais em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*

### 1. Introdução

O microbioma oral tem uma enorme diversidade que abrange mais de 700 taxa microbiana, a qual inclui mais de 10.000 filotipos.<sup>1</sup> Os microrganismos que colonizam a cavidade oral (microbiota residente) diferem da microbiota transitória por serem capazes de co-evoluir com o hospedeiro, sendo altamente especializados e adaptados para sobreviver em nichos ecológicos específicos.<sup>2</sup>

*Staphylococcus aureus* pode ser detetado como microrganismo comensal na cavidade oral de pacientes saudáveis<sup>3-4</sup>, dentro de bolsas periodontais uma hora após a inserção cirúrgica de implantes dentários de titânio.<sup>5-6</sup> Embora a colonização oral por *Staphylococcus aureus* possa ser transitória, também pode atuar na patogênese da doença oral.<sup>7</sup> Estudos mostraram que os estafilococos estão mais frequentemente associados à peri-implantite do que à saúde peri-implantar<sup>8-9</sup> e encontraram contagens mais altas de DNA de *Staphylococcus aureus* na superfície de implantes dentários do que em dentes naturais.<sup>10-11</sup>

Na Europa, uma análise retrospectiva de 10 anos (1998-2007) de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de nichos orais e periorais, mostrou que 18% dos pacientes estavam colonizados por esta bactéria. Destas estirpes, 90% eram *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e 10% eram *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Ambos os tipos de *Staphylococcus aureus* estavam associados à doença da mucosa (eritema e ardência na boca), em maior número em idosos, em pacientes portadores de prótese dentária e em pacientes com secreção salivar reduzida.<sup>12-13</sup>

A proporção global de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade (CA-MRSA) aumentou de 8% em 2004 para 43% em 2014.<sup>14</sup> Esse fenômeno mundial, deve-se ao surgimento de clones resistentes ao CA-MRSA entre pessoas saudáveis que não possuem cuidados de saúde tradicionais, associados a fatores de risco como: indivíduos idosos, após tratamento de cancro oral<sup>15</sup>, populações infectadas pelo vírus HIV e após procedimentos cirúrgicos protéticos.<sup>16-17</sup>

Um biofilme associado à saúde inclui comunidades de microrganismos que interagem entre si devido à proximidade física, de maneira simbiótica e equilibrada com o hospedeiro. A presença

de *Staphylococcus aureus* oral pode ser considerada como um desregulador dessa relação simbiótica benéfica. Uma maior diversidade microbiana no biofilme desregula a homeostasia e as respostas imune e inflamatória. Nesta situação, microrganismos não orais podem tirar proveito da disponibilidade nutricional alterada de potenciais substratos no fluido gengival, saliva ou sangue, para se integrarem no biofilme oral. A consequência é um biofilme descontrolado que se torna desequilibrado, iniciando e sustentando assim um processo de doença.<sup>18</sup>

O Relatório de Consenso 2017 para Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares concordou que a periodontite, a mucosite peri-implantar e a peri-implantite, têm como etiologia principal um biofilme disbiótico<sup>19</sup> e que o manejo desse biofilme continua sendo a principal abordagem preventiva.<sup>20-21</sup>

O envolvimento dos estafilococos na peri-implantite reside na sua capacidade de se ligar de forma eficiente às superfícies de titânio e contribuir para infecções associadas a dispositivos médicos.<sup>22-23</sup> Assim, em pacientes portadores, um implante dentário fornece um ambiente ecológico favorável para *Staphylococcus aureus* aderir. Isto é seguido por sua colonização e maturação dentro da microbiota oral associada à saúde no implante, levando a mudanças na composição e comportamento deste biofilme até um estado intolerável para os tecidos do hospedeiro.<sup>24-25</sup> Estes dados estão de acordo com a capacidade de *Staphylococcus aureus* causar osteomielite e infecções sistêmicas, como pneumonia<sup>26-27</sup>, dermonecrose<sup>28</sup>, endocardite<sup>29</sup> e síndrome do choque tóxico.<sup>30</sup>

A ligação de *Staphylococcus aureus* ao tecido ou a uma superfície de titânio é mediada por moléculas adesivas de superfície de matriz (MSCRAMMs)<sup>31-32</sup> expressas durante a colonização e ligação ao hospedeiro através de proteínas<sup>33-34</sup> que estão na saliva ou no plasma (por exemplo, colagênio ou fibronectina).<sup>35-37</sup> Com o exposto, hipotetizamos neste trabalho se *Staphylococcus aureus* seria capaz de integrar o arranjo estrutural do biofilme oral e interagir com a microbiota supragengival residente, aumentando o risco de cáries, periodontite e peri-implantite.

## 2. Objetivo

Investigar se a presença de *Staphylococcus aureus* favorece uma mudança na composição do biofilme supragengival *in vitro*.

### 3. Material e Métodos

Os resultados preliminares apresentados neste projeto foram desenvolvidos durante a minha formação acadêmica e fundamentaram este estudo.

#### Estirpes bacterianas e condições de crescimento

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram selecionadas com base na relevância clínica e genótipo, incluindo tipo de sequência multilocus (MLST ou ST)<sup>38</sup>, tipo de spa<sup>39</sup>, tipo agr, cromossoma cassete tipo mec (SCC), e a presença ou ausência do gene F da leucocidina panton-Valentine (LukF-PVL). As resistências aos antibióticos foram determinadas usando o sistema Vitek2 com cartões AST-P632 (bioMérieux, Nürtingen, Alemanha) como relatado anteriormente.<sup>40</sup> Informações detalhadas do genótipo, perfil do gene de virulência e antibiograma dos isolados clínicos de PN35 e HU13N estão descritas na Tabela 2. Abordamos a questão se linhagens diferentes de *Staphylococcus aureus*, por meio da aquisição de resistência a antibióticos e pela presença do fator leucocidina F Panton-Valentine (LukF-PVL), permitiriam o seu crescimento de forma sustentada num biofilme oral polimicrobiano. Para isso, inoculamos juntamente com biofilme multiespécies: 1) um *Staphylococcus aureus* multirresistente (CA-MRSA, o SF8300\_USA300) que acumulou resistência à mupirocina, clindamicina, tetraciclina, além de meticilina e beta-lactâmicos e é um clone positivo para Leukocidin F-Panton Valentine (LukF-PVL+); 2) um isolado nasal CA-MRSA, USA800, denominado HU13N, com resistência à eritromicina e ciprofloxacina, além de meticilina e beta-lactâmicos, que não possuem o gene Leukocidin F-Panton Valentine (LukF-PVL-), 3) um *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA), isolado da bolsa periodontal, denominado PN35, embora raro, assemelha-se ao CC72-MSSA com resistência à eritromicina e à benzilpenicilina e não possui o gene Leukocidin F-Panton Valentine (LukF-PVL-). Como controlo MSSA, usamos a estirpe ATCC 25923, nomeada neste estudo OMZ1122, que é sensível à meticilina e expressa o gene Leukocidin F-Panton Valentine (LukF-PVL +). (Tabela 1)

Tabela 1. Estirpes de *Staphylococcus aureus* utilizadas neste estudo.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Local isolado, descrição	Características relevantes (MLST, SSCmec)	LukF-PVL	Referência
SF8300_USA300 (USA300)	São Francisco California, EUA, CA-MRSA de um abscesso.	Multi-resistant, SCCmec IV.	+	50

HU13N	Rio de Janeiro, Brasil CA-MRSA isolado nasal.	Non multi-resistant, USA300, SCCmec IV.	-	51
PN35	Rio de Janeiro, Brasil MSSA, bolsa periodontal.	metilicilin-sensitive, mecA -	-	<i>In press</i>
OMZ1122	Seattle, EUA, ATCC 25923.	metilicilin-sensitive, mecA -	+	52
SF8300_ΔMSCRAMMs (ΔMSCRAMMs)	Estirpe mutante do SF8300_USA300	Delecao in-frame de clfA, clfB, sdrC, sdrD, sdrE, fnbA, fnbB	+	<i>In press</i>

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram cultivadas encubadas com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C durante 3 dias. Para isso, foram utilizadas placas de agar sangue (5% de sangue de cavalo desfibrinado, 5mg de hemina / l, 10 mg de vitamina K / l, agar Columbia), em placas de agar trypticase de soja ou caldo trypticase de soja (TSB), suplementado com 0,6% de extrato de levedura e glicose a 0,8% (Difco). Após o cultivo anaeróbio por 64 horas a 37° C, os números das espécies microbianas orais individuais dentro dos biofilmes foram estimados pela contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs).

O SF8300, uma estirpe genótipo protótipo USA300-0114 de tipo selvagem foi usado como base para o derivado mutante sequencial, ou seja, (ΔMSCRAMMs), com substituição alélica de sete genes que codificam os componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva (clfA, clfB, sdrC, sdrD, sdrE, fnBPA e fnBPB).<sup>41</sup>

### Formação e extração de biofilme em múltiplas espécies

Além das estirpes de *Staphylococcus aureus* SF8300, ΔMSCRAMMs, PN35 e HU13N, as seguintes seis espécies foram utilizadas neste estudo: *Actinomyces oris* (OMZ 745), *Candida albicans* (OMZ 110), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* KP-F2 (OMZ 598), *Streptococcus oralis* SK248 (OMZ 607), *Streptococcus mutans* UA159 (OMZ 918) e *Veillonella dispar* ATCC 17748T (OMZ 493). Um biofilme múltiplo de seis espécies com a exceção de estirpes de *Staphylococcus aureus* foi cultivado como previamente relatado,<sup>42</sup> e está no presente trabalho, nomeado como "biofilme controlo". Quatro biofilmes modificados de 7 espécies, nomeadamente o biofilme SF8300 (6 espécies biofilme + USA300), biofilme ΔMSCRAMM (6 espécies de biofilme + ΔMSCRAMMs), biofilme MSSA (6 espécies biofilme + PN35) e MRSA (6 espécies biofilme + HU10L) também foram desenvolvidos em paralelo. Resumidamente, 200 µl de cada espécie com densidades óticas semelhantes (DO<sub>550</sub> = 1,0 ± 0,05) foram carregados nas placas de hidroxiapatite e incubados em anaerobiose por 64 h. Durante a incubação, o meio cultivado foi reabastecido às 16 e 40 horas. As placas de biofilme

foram lavadas por mergulho em NaCl a 0,9% p/v, às 16 h, 20 h, 40 h, 44 h, 48 h e 64 h. Depois de desenvolvidos, os biofilmes foram suspensos em NaCl a 0,9% p/v para contagem de UFCs ou fixados em paraformaldeído a 4% para análise de imagens.

### **Análise de imagem com CLSM**

Os biofilmes fixados em paraformaldeído foram corados por hibridação fluorescente *in situ* e submetidos a CLSM para análise imaginária. Em resumo, 64 h de biofilmes foram fixados imediatamente com 4% (p/v) de paraformaldeído por 1 h a 4° C, permeabilizados por 30 min a 37 ° C por exposição à mistura (46.200 U / mL ou 1 mg / mL de lisozima , Tris / HCl 98 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5. Adicionou-se 100 u / ml de mutanolisina extra para o grupo 5SP + LGG), pré-hibridado em tampão de hibridação (NaCl 0,9 M, Tris / HCl 20 mM, formamida a 30% , 0,01% SDS) a 46° C durante 15 min, e seguido de hibridação durante 3 h com oligonucleotídeos marcados com fluorescência. Para isso foi utilizado: Saur229, sonda oligonucleotídica 16S rRNA marcada com cy3 de *Staphylococcus aureus* (5'-CTAATGCAGCGCGATCC-3'), concentração de formamida 40% e concentração de NaCl em tampão de lavagem: 46 mM; MIT446-FAM, sonda oligonucleotídica 16S rRNA da concentração de formamida de *Streptococcus oralis* (5'-ACACCGTTCTTCTTACAA-3') 25% e concentração de NaCl em tampão de lavagem: 46mM<sup>43</sup> MUT590-Cy5 (5'-ACTCCAGACTTTCCTGAC-3') Concentração de formamida 30% e concentração de NaCl em tampão de lavagem: 46mM.<sup>44</sup> Posteriormente, todas as amostras foram incluídas em Mowiol durante a noite à temperatura ambiente. Para a contrastação, os biofilmes foram corados com 400 ul de 4X6-diamidino-2-fenilindole (DAPI 0,5 ng / ul em Nanopure H<sub>2</sub>O) por 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 100 Å (imersão em glicerol, NA 1.3, Leica Microsystems) num microscópio confocal Leica sp5 (Leica Microsystems). Os filtros no microscópio foram definidos para 555-567 nm, 570-630 nm e 660-710 para a detecção de cores de Cy3, Cy5, respetivamente e 498-518 para a detecção de cores de FAM. As imagens capturadas foram processadas usando o software Imaris (versão 7.4.0, Bitplane) para reconstruir o biofilme.

### **Contagem de UFCs nos meios seletivos**

As contagens de UFCs foram realizadas para quantificar o número de espécies individuais nos diferentes modelos de biofilme. As suspensões de biofilme foram diluídas sete vezes em série 10x em NaCl a 0,9% p / v para obter pelo menos uma placa contendo 20-200 UFCs.

Resumidamente, 50 µl de cada suspensão diluída foram plaqueados usando um diluidor espiral EDDY Jet Auto (instrumentos IUL). Placas de agar mitis salivarius Difco™ (Becton, Dickinson and Company) suplementadas com telurito de sódio a 0,001% p/v (BDH Chemicals Ltd) foram utilizadas para isolar *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mutans*. Placas de agar para anaeróbios (Neogen) contendo 1 mg / l de eritromicina (Sigma-Aldrich), 4 mg / l de vancomicina (Sigma-Aldrich) e 1 mg / l de norfloxacinina foram utilizadas para cultivar seletivamente *Fusobacterium nucleatum*. Placas de meio agar Nickerson Difco foram usadas para cultivar *Candida albicans*. Utilizou-se placas de agar de sangue Columbia (Oxoid) suplementadas com 5% de sangue humano para cultivar seletivamente as restantes espécies. Nove réplicas biológicas foram realizadas para fins de contagem.

### Análise estatística

O teste t para amostras independentes ou um one-way ANOVA foram usados para calcular as significâncias estatísticas dos dados microbiológicos do crescimento do biofilme e da contagem de UFCs. O teste *post hoc* de Bonferroni foi usado para comparações entre os grupos individuais (Prism v.6 software GraphPad). Os dados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ . Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

## 4. Resultados/Discussão

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram capazes de se integrar bem no modelo de biofilme supragengival de seis espécies que contém *Actinomyces oris*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans* cultivados em discos de hidroxiapatite. Com exceção de *Candida albicans*, todos os microrganismos aumentaram em número quando as estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (SF8300\_USA300 ou HU13N) foram inoculadas juntamente com os outros microrganismos. As estirpes de CA-MRSA também favorecem um deslocamento na contagem de unidades formadoras de colónias totais (UFCs) para o biofilme supragengival de seis espécies, não observado para as estirpes de MSSA. Houve uma redução estatisticamente significativa nos números de UFCs para a estirpe MSSA - PN35 em comparação com ambas as estirpes de CA-MRSA testadas ( $p < 0,0001$ ). Este resultado sugere que sob condições *in vitro* a estirpe MSSA tem menos capacidade para crescer dentro do biofilme supragengival de seis espécies do que as estirpes CA-MRSA (Figura 1 e Tabela 2).

Embora a leucocidina F estafilocócica Panton-Valentine (LukF-PVL) seja considerada uma das



estratégias utilizadas pelo MRSA para persistir eficientemente no biofilme humano durante infecções crônicas, não constatamos nenhuma diferença entre ambas as estirpes de CA-MRSA testadas, SF8300\_USA300 que é um LukF-PVL + (positivo) e HU13N que é um LukF-PVL - (negativo). De acordo com outros estudos<sup>26,45-49</sup>, LukF-PVL é um fator de virulência que certamente desempenha um papel importante na infecção por MRSA, mas não é de longe o único. Portanto, devemos também considerar os tipos de infecção e outras causas que parecem contribuir significativamente para a gravidade da doença causada por CA-MRSA. Por outro lado, evidenciou-se uma diferença significativa no crescimento entre as estirpes MSSA testadas. A OMZ1122 que é LukF-PVL + (positiva) apresentou números maiores no biofilme polimicrobiano do que a linhagem PN35, que é LukF-PVL- (negativo) (Figura 1 e Tabela 2).

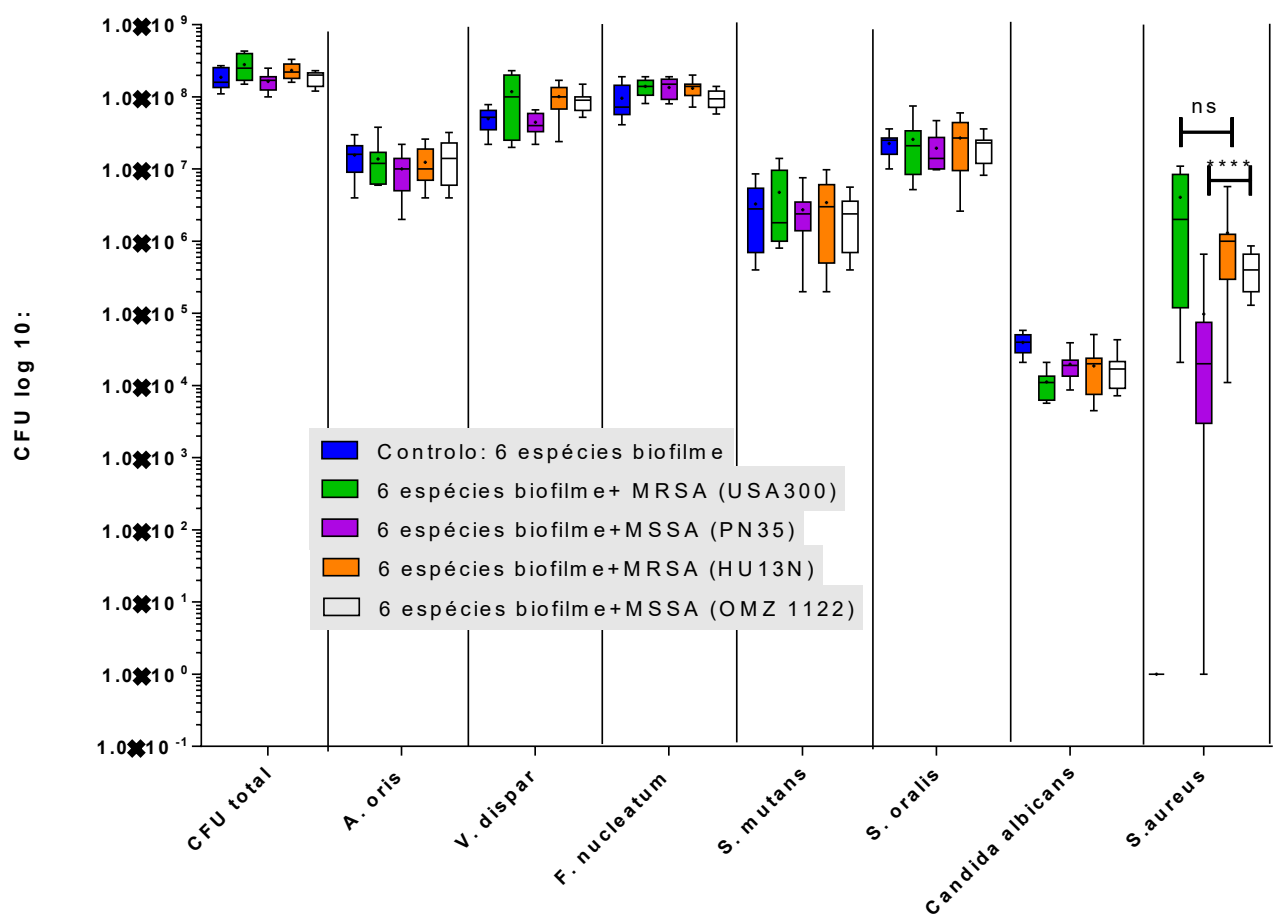


Figura 1: Análise da composição quantitativa dos biofilmes multiespécies bucais. A quantificação foi realizada utilizando contagem de UFCs para cada espécie por disco de biofilme, conforme descrito em materiais e métodos.

Como indicado, os biofilmes controlo não incluíram nenhuma estirpe de *Staphylococcus aureus*, enquanto os biofilmes experimentados continham a estirpe de *Staphylococcus aureus*. SF8300\_USA300 (USA300), PN35, HU13N ou OMZ1122. Os dados são expressos como as contagens médias bacterianas  $\pm$  DP de 9 réplicas biológicas. Teste de ANOVA: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Não houve significância estatística (ns) no crescimento entre os SF8300\_USA300 e HU13N ( $P = 0,5273$ ).

Tabela 2: Biofilme supragengival de seis espécies suplementado com estirpes de MRSA e MSSA.

Média $\pm$ DP n=9	a	b	c	d	e
	6 espécies biofilme controlo	6 espécies + CA-MRSA, LukF-PVL+ (SF8300_USA300)	6 espécies + MSSA LukF-PVL- (PN35)	6 espécies + CA-MRSA, LukF-PVL- (HU13N)	6 espécies + CA-MSSA, LukF-PVL+ (OMI1122)
UFCs totais	$1.87 \times 10^8 + 6.08 \times 10^7$	$2.81 \times 10^8 + 1.12 \times 10^8$	$1.63 \times 10^8 + 4.58 \times 10^7$	$2.32 \times 10^8 + 5.84 \times 10^7$	$1.84 \times 10^8 + 4.03 \times 10^7$
<i>Actinomyces oris</i>	$1.56 \times 10^7 + 7.98 \times 10^6$	$1.38 \times 10^7 + 1.01 \times 10^7$	$1 \times 10^7 + 6.32 \times 10^6$	$1.24 \times 10^7 + 7.46 \times 10^6$	$1.511 \times 10^7 + 1.00 \times 10^7$
<i>Veillonella dispar</i>	$5 \times 10^7 + 1.78 \times 10^7$	$1.18 \times 10^8 + 8.68 \times 10^7$	$4.47 \times 10^7 + 1.49 \times 10^7$	$1.01 \times 10^8 + 4.69 \times 10^7$	$8.89 \times 10^7 + 2.87 \times 10^7$
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$9.54 \times 10^7 + 5.15 \times 10^7$	$1.41 \times 10^8 + 3.65 \times 10^7$	$1.35 \times 10^8 + 4.21 \times 10^7$	$1.32 \times 10^8 + 3.65 \times 10^7$	$9.69 \times 10^7 + 2.81 \times 10^7$
<i>Streptococcus mutans</i>	$3.29 \times 10^6 + 2.82 \times 10^6$	$4.76 \times 10^6 + 5.12 \times 10^6$	$2.73 \times 10^6 + 2.11 \times 10^6$	$3.42 \times 10^6 + 3.39 \times 10^6$	$2.46 \times 10^6 + 1.70 \times 10^6$
<i>Streptococcus oralis</i>	$2.27 \times 10^7 + 7.78 \times 10^6$	$2.57 \times 10^7 + 2.15 \times 10^7$	$1.94 \times 10^7 + 1.31 \times 10^7$	$2.68 \times 10^7 + 1.96 \times 10^7$	$2.05 \times 10^7 + 8.65 \times 10^6$
<i>Candida albicans</i>	$3.97 \times 10^4 + 1.27 \times 10^4$	$1.12 \times 10^4 + 4.87 \times 10^3$	$1.97 \times 10^4 + 8.60 \times 10^3$	$1.87 \times 10^4 + 1.44 \times 10^4$	$1.76 \times 10^4 + 1.09 \times 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	$4.04 \times 10^6 + 4.29 \times 10^6$ **** $P < 0.0001$	$9.80 \times 10^4 + 2.13 \times 10^5$	$1.31 \times 10^6 + 1.71 \times 10^6$ **** $P < 0.0001$	$4.37 \times 10^5 + 2.52 \times 10^5$ **** $P < 0.0001$

Em seguida, investigamos a influência dos componentes superficiais microbianos que reconhecem moléculas de matriz adesiva, denominadas MSCRAMMs, no crescimento de *Staphylococcus aureus* no ambiente de biofilme multiespécie. A investigação comparativa da estirpe mutante *Staphylococcus aureus* ( $\Delta$ MSCRAMMs) e da estirpe selvagem *Staphylococcus aureus* SF8300\_USA300 revelou que havia números significativamente menores de *Staphylococcus aureus* ( $\Delta$ MSCRAMMs) em relação ao SF8300\_USA300 tipo selvagem ( $p < 0,001$ ). Ainda comparando a linhagem *Staphylococcus aureus* mutante ( $\Delta$ MSCRAMMs) com *Staphylococcus aureus* tipo selvagem SF8300\_USA300, observamos números reduzidos para os seguintes microrganismos presentes no biofilme multiespécie: *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. Na presença da estirpe mutante de *Staphylococcus aureus*  $\Delta$ MSCRAMMs, o crescimento desses microrganismos foi reduzido para números próximos aos níveis normais, conforme quantificado no biofilme controlo (biofilme de 6 espécies) (Figura 2 e Tabela 3).

MSCRAMMs tem importância bem descrita no início do processo de patogênese de

*Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos com a estirpe mutante  $\Delta$ MSCRAMM confirmam que estas proteínas adesivas da superfície, podem desempenhar um papel importante na colonização de *Staphylococcus aureus* e sugerem a sua participação no crescimento de outras espécies. Neste estudo, ficou demonstrado que existe uma tendência para a estirpe de *Staphylococcus aureus* SF8300\_USA300 promover a disbiose *in vitro* do biofilme supragengival, aumentando os números totais de UFCs do biofilme de controlo. Pelo contrário, quando a estirpe mutante  $\Delta$ MSCRAMMs é inoculada no biofilme de 6 espécies, este aumento não é observado.

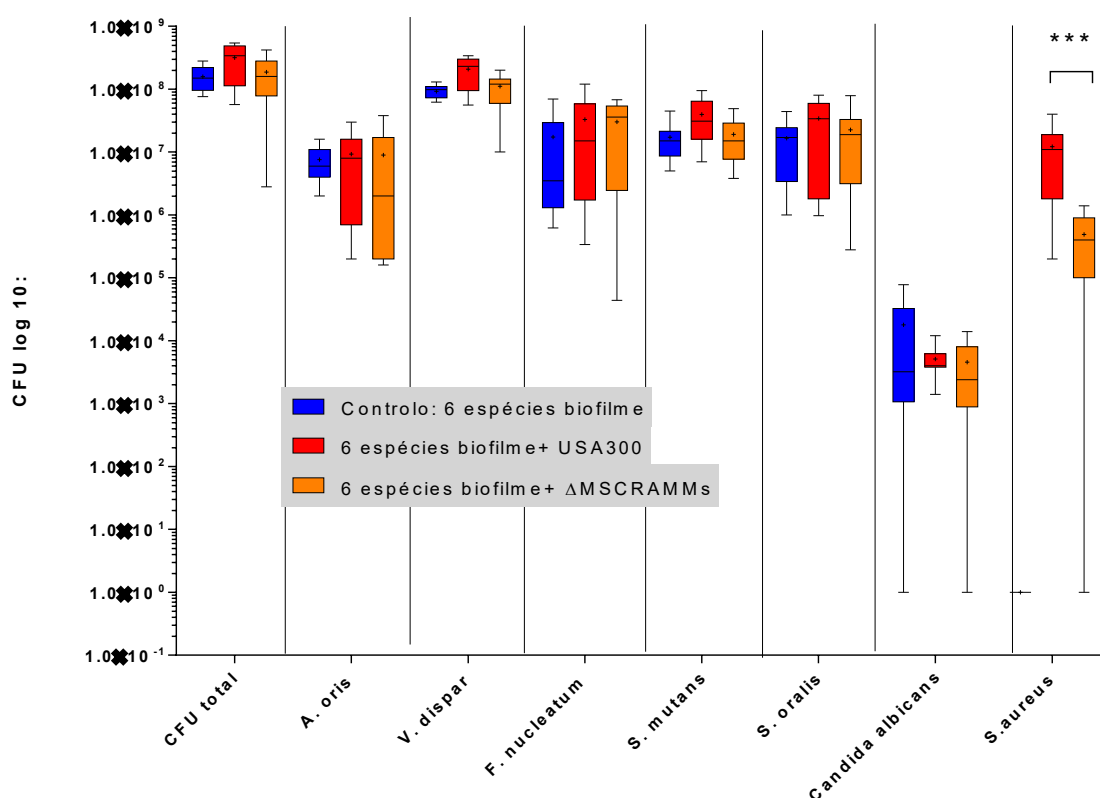


Figura 2: Análise da composição quantitativa dos biofilmes orais multiespécies. A quantificação foi realizada utilizando contagem de UFCs para cada espécie por disco de biofilme, conforme descrito em materiais e métodos. Como indicado, os biofilmes de controlo não incluíram nenhuma estirpe de *Staphylococcus aureus*, enquanto os biofilmes experimentais continham a estirpe de *Staphylococcus aureus* de tipo selvagem: SF8300\_USA300 (USA300) ou a estirpe mutante de *Staphylococcus aureus* SF8300\_MSCRAMMs ( $\Delta$ MSCRAMMs). Os dados foram expressos como as contagens médias bacterianas  $\pm$  DP de 9 réplicas biológicas. Teste de ANOVA: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tabela 3: Biofilme supragengival de 6 espécies suplementado com SF8300\_USA300 ou com  $\Delta$ MSCRAMMs.

Média $\pm$ DP n=9	a	b	c

	6 espécies biofilme controlo	6 espécies <i>Staphylococcus aureus</i> (SF8300_USA300)	6 espécies + <i>Staphylococcus aureus</i> (ΔMSCRAMMs)
UFCs totais	1.58x10 <sup>8</sup> + 7.33x10 <sup>7</sup>	3.17x10 <sup>8</sup> + 1.88x10 <sup>8</sup>	1.87x10 <sup>8</sup> + 1.32x10 <sup>8</sup>
<i>Actinomyces oris</i>	7.55x10 <sup>6</sup> + 4.66x10 <sup>6</sup>	9.28x10 <sup>6</sup> + 1.01x10 <sup>7</sup>	8.95x10 <sup>6</sup> + 1.28x10 <sup>7</sup>
<i>Veillonella dispar</i>	9.26x10 <sup>7</sup> + 2.23x10 <sup>7</sup>	2.07x10 <sup>8</sup> + 1.03x10 <sup>8</sup>	1.11x10 <sup>8</sup> + 5.98x10 <sup>7</sup>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1.72x10 <sup>7</sup> + 2.35x10 <sup>7</sup>	3.31x10 <sup>7</sup> + 3.98x10 <sup>7</sup>	3.03x10 <sup>7</sup> + 2.66x10 <sup>7</sup>
<i>Streptococcus mutans</i>	1.71x10 <sup>7</sup> + 1.19x10 <sup>7</sup>	3.95x10 <sup>7</sup> + 3.02x10 <sup>7</sup>	1.90x10 <sup>7</sup> + 1.52x10 <sup>7</sup>
<i>Streptococcus oralis</i>	1.66x10 <sup>7</sup> + 1.38x10 <sup>7</sup>	3.41x10 <sup>7</sup> + 2.97x10 <sup>7</sup>	2.25x10 <sup>7</sup> + 2.50x10 <sup>7</sup>
<i>Candida albicans</i>	1.79x10 <sup>4</sup> + 2.80x10 <sup>4</sup>	5.12x10 <sup>4</sup> + 2.95x10 <sup>3</sup>	4.55x10 <sup>4</sup> + 4.78x10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	1.22x10 <sup>7</sup> + 1.26x10 <sup>7</sup>	4.88x10 <sup>5</sup> + 4.80x10 <sup>5</sup>  *** P<0.001

Uma investigação adicional da estrutura do biofilme multiespécie por meio da microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) corroborou os resultados das UFCs obtidas em cultura. Revelamos a localização das células de *Staphylococcus aureus* juntamente com as outras seis espécies do biofilme. Como esperado, as células da estirpe *Staphylococcus aureus* de tipo selvagem (SF8300\_USA300) apareceram mais abundantes nos biofilmes em comparação com as células da estirpe mutante *Staphylococcus aureus* (ΔMSCRAMMs). Além disso, a CLSM revelou alterações aparentes em relação à conformação estrutural dos biofilmes quando a estirpe de *Staphylococcus aureus* do tipo selvagem (SF8300\_USA300) foi adicionada a este conjunto (Figura 3A e 3B). Neste caso, a localização de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* dentro da estrutura do biofilme ficou evidentemente agrupada na proximidade de agregados de *Staphylococcus aureus* e distribuída, principalmente, no lado "interno" do biofilme mais próximo da superfície do disco de hidroxiapatite (Figura 3B).

A co-localização de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* com agregados de *Staphylococcus aureus* não foi mais observada quando ao biofilme foi associada a estirpe mutante ΔMSCRAMMs (Figura 4 A e B). Dois factos podem ser descritos a partir deste resultado: 1) Existe uma preferência dos estreptococos para se agruparem na proximidade de onde *Staphylococcus aureus* está a crescer: quanto maior o número de estafilococos maior a possibilidade de ocorrer a agregação de estreptococos; 2) As proteínas MSCRAMMs de *Staphylococcus aureus* são também importantes para o crescimento e co-localização de

*Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* neste modelo de biofilme oral multiespécies.

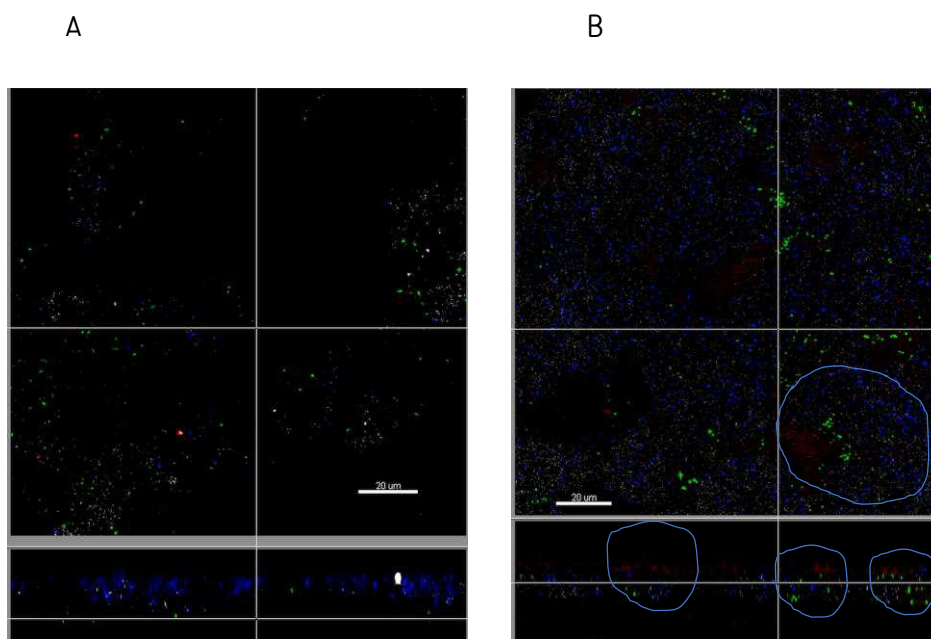


Figura 3: Localização de *Streptococcus oralis* e de *Streptococcus mutans* nos biofilmes. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de biofilme fluorescente de 6 espécies (FISH) com hibridização *in situ* (FISH) (biofilme controle) em A. Biofilme de 7 espécies (biofilme de 6 espécies com adição de *Staphylococcus aureus* tipo selvagem (SF8300\_USA300), em B. Células do biofilme em cinza, corado com Dapi, e *Staphylococcus aureus* corado com (Saur229-Cy3) aparece em **vermelho**. Devido à coloração MIT446-FAM, *Streptococcus oralis* aparece a **verde** e devido à coloração MUT590-Cy5, *Streptococcus mutans* aparece a **azul**. O biofilme foi de 32,6 µm (imagem 3A) e 45,448 µm (imagem 3B), com escala de 20 µm.

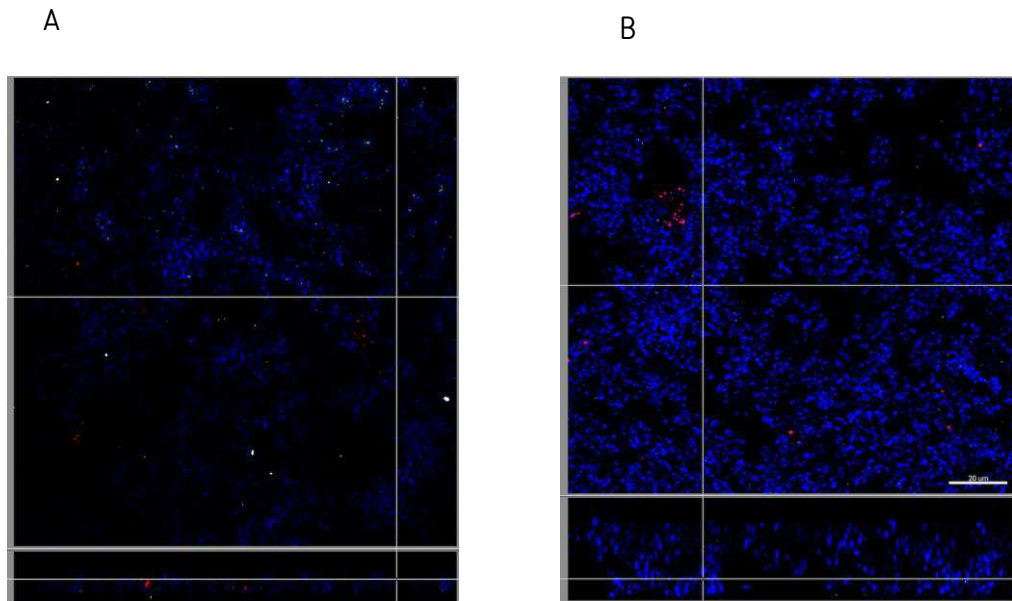


Figura 4: Localização de *Streptococcus oralis* em A e de *Streptococcus mutans* em B dentro dos biofilmes. Imagens confocais de microscopia por varredura a laser de biofilme fluorescente de 7 espécies com hibridização *in situ* (FISH) (com a adição da estirpe mutante *Staphylococcus aureus*,  $\Delta$ MSCRAMMs). As células do biofilme são mostradas em azul e a linhagem  $\Delta$ MSCRAMMs corada com Saur229-Cy3 aparece vermelha. Devido à coloração com MIT446-FAM, *Streptococcus oralis* aparece em verde (A) e, devido à coloração com MUT590-FAM, *Streptococcus mutans* aparece em verde (B). A espessura do biofilme foi 17,1  $\mu$ m (imagem 2A) e 16,1  $\mu$ m (imagem B). Escala = 20  $\mu$ m.

## 5. Conclusão

O controlo do biofilme oral é fundamental para uma abordagem preventiva das doenças orais. A co-presença de *Staphylococcus aureus* promoveu *in vitro* a disbiose do biofilme multiespécies.

A estirpe *Staphylococcus aureus* do tipo selvagem aumentou o número de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella dispar* no biofilme supragengival.

A presença de *Staphylococcus aureus* do tipo selvagem modificou a localização de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus oralis* no biofilme supragengival. Ocorreu uma co-localização desta espécie com os agregados celulares de *Staphylococcus aureus* nas proximidades do disco de hidroxiapatite.

Na presença da linhagem mutante de *Staphylococcus aureus*,  $\Delta$ MSCRAMMs, o crescimento de estreptococos foi reduzido a um nível normal e homeostático e a sua apresentação no biofilme foi de forma difusa e não em agregados.

Os resultados sugerem que na presença de *Staphylococcus aureus* o biofilme supragengival sofre disbiose favorecendo o risco de doenças orais. Neste cenário, o crescimento e co-localização dos estreptococos pode representar um risco aumentado no desenvolvimento de cáries e o aumento no crescimento de outras espécies como *Veillonella dispar* e *Fusobacterium nucleatum*, um risco aumentado para o desenvolvimento de doença periodontal.

## 6. Bibliografia

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43(11):5721-32.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005;38:135-87.
3. Jiyoung A, Liying Y, Bruce JP, Ian G, Luc M, Zhiheng P, Richard BH. Oral Microbiome Profiles: 16S rRNA Pyrosequencing and Microarray Assay Comparison. *PLoS One* 2011;6(7):e22788.
4. Thurnheer T, Belibasakis GN. Integration of non-oral bacteria into *in vitro* oral biofilms. *Virulence* 2015;6(3):258-64.
5. Kronström M, Svenson B, Hellman M, Persson GR. Early implant failures in patients treated with Brånemark System titanium dental implants: a retrospective study. *The International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 2001;16:201-7.
6. Salvi GE, Fürst MM, Lang N P, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical Oral Implants Research* 2008;19(3):242-8.
7. Koukos G, Sakellari D, Arsenakis M, Tsalikis L, Slini T, Konstantinidis A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Archives of Oral Biology* 2015;60(9):1410-5.
8. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs Peri-implantitis. *Periodontology* 2000 2010;53:167–81.
9. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2014;16(6):783-93.
10. Renvert S, Lindahl C, Renvert H, Persson GR. Clinical and microbiological analysis of subjects treated with branemark or astratech implants: a 7-year follow-up study. *Clinical Oral Implants Research* 2008;19:342–7.
11. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archives of Oral Biology* 2014;59:66–72.
12. Bagg J, Sweeney MP, Harvey-Wood K, Wiggins A. Possible role of *Staphylococcus aureus* in severe oral mucositis among elderly dehydrated patients. *Microbiol Ecology in Health and Disease* 1995;8:51-6.
13. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G.



*Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? American Journal of Infection Control 2015;43(1):35-7.

14. Olearo F, Albrich WC, Vernaz N, Harbarth S, Kronenberg A. *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in Switzerland: regional differences and trends from 2004 to 2014. Swiss Centre for Antibiotic resistance (ANRESIS), Swiss Med Wkly 2016;146 w14339.
15. Petti S, Polimeni A. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission in the dental healthcare setting: a narrative review. Infection Control and Hospital Epidemiology 2011 Nov;32(11):1109-15.
16. Mégevand C, Gervaix A, Heininger U, Berger C, Aebi C, Vaudaux B, et al. Paediatric Infectious Disease Group. Switzerland *Staphylococcus aureus* Study Group. Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. Clinical Microbiology and Infection 2010;16(9):1414-20.
17. Rouha H, Weber S, Janesch P, Maierhofer B, Dolezilkoval I, Mirkina I, et al. Disarming *Staphylococcus aureus* from destroying human cells by simultaneously neutralizing six cytotoxins with two human monoclonal antibodies. Virulence 2018;9(1):231-47.
18. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. Clinical Periodontology 2017;44(18): S5-S11.
19. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. Journal of Clinical Periodontology 2017;44(5):456-462.
20. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. Journal of Periodontology 2018;89 Suppl1:S313-S318.
21. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. Journal of Clinical Periodontology 2018; 45 Suppl20:S68-S77.
22. Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-implant infections of

oral biofilm etiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2015;830: 69-84.

23. Thurnheer T, Belibasakis GN. Incorporation of staphylococci into titanium-grown biofilms: an in vitro "submucosal" biofilm model for peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research* 2016;27: 890–95.
24. Pratten J, Foster SJ, Chan PF, Wilson M, Nair SP. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes and Infection* 2001;3(8):633-7.
25. Mombelli A, Décaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38 Suppl.11:203–213.
26. Diep B, Le VT, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, et al. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Science Translational Medicine* 2016;8:357,124.
27. Diep B, Hilliard J, Minh VL, Tkaczyk C, Le H, Tran V, et al. Targeting alpha toxin to mitigate its lethal toxicity in ferret and rabbit models of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2017;24,61:4 02456-02516.
28. Le VT, Tkaczyk C, Chau S, Rao RL, Dip EC, Pereira-Franchi EP et al. Critical role of alpha-toxin and protective effects of its neutralization by a human antibody in acute bacterial skin and skin structure infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;23,60(10):5640-8.
29. Chan L, Basuino L, Dip EC, Chambers HF. Comparative efficacy of tedizolid phosphate (prodrug of tedizolid), vancomycin and daptomycin in a rabbit model of methicillin-resistant endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59:6 3252-6.
30. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews* 2015;28(3):603-61.
31. Marraffini L A, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2006;70,1:192–221.
32. Otto M. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiology Reviews* 2014;38:1250–70.
33. O'Brien-Simpson NM, Holden JA, Lenzo JC, Tan Y, Brammar GC, Walsh KA, et al. A therapeutic *Porphyromonas gingivalis* gingipain vaccine induces neutralising IgG1 antibodies that protect against experimental periodontitis. *Npj Vaccines* 2016;1:16022.
34. Tkaczyk C, Hamilton MM, Sadowska A, Shi Y, Chang CS, Chowdhury P, et al. Targeting

- alpha toxin and clfA with a multimechanistic monoclonal antibody-based approach for prophylaxis of serious *Staphylococcus aureus* Disease. MBio 2016;(7) 3.
35. Llena-Puy MC, MontaAana-Llorens C, Forner-Navarro L. Fibronectin levels in stimulated whole-saliva and their relationship with cariogenic oral bacteria. International Dental Journal 2000;50,57-59.
  36. Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. FEMS Microbiology Reviews 2011;35:1 147–200.
  37. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nature Reviews Microbiology 2014;12(1):49-62.
  38. Strommenger B, Bräulke C, Pasemann B, Schmidt C, Witte W. Multiplex PCR for rapid detection of *Staphylococcus aureus* isolates suspected to represent community-acquired strains. Journal of Clinical Microbiology 2008;46:582–587.
  39. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. Journal of Clinical Microbiology 2003;41:5442–5448.
  40. Holtfreter S, Grumann D, Balau V, Barwich A, Kolata J, Goehler A, et al. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the General Population in Northeast Germany: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0). Journal of Clinical Microbiology 2016 Nov;54(11):2774-2785.
  41. Bae T, Schneewind O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. Plasmid 2006; 55(1):58-63.
  42. Thurnheer T, van der Ploeg J R, Giertsen E, Guggenheim B. Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms *in vitro*. Caries Research 2006;40,163–171.
  43. Thurnheer, T, Gmur, R, Guggenheim, B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. Journal of Microbiology Methods 2004;56,37–47.
  44. Quevedo B, Giertsen E, Zijngje V, Luthi-Schaller H, Guggenheim B, Thurnheer T, et al. Phylogenetic group- and species-specific oligonucleotide probes for single-cell detection of lactic acid bacteria in oral biofilms. BMC Microbiology 2011;11:14.
  45. Otter J A, French G L. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infection Diseases 2010;10, 227–239.

46. Lee S M, Ender M, Adhikari R, Smith JMB, Berger-Bächli B, Cook G M. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2007;51,1497–1499.
47. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, Deleo FR, Otto M. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Infectious Diseases* 2010;202, 1866–1876.
48. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxin gene hitchhikes on a transferable antibiotic resistance element. *Virulence* 2010;1, 49–51.
49. Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? *International Journal of Medical Microbiology* 2013;303(6-7):324-30.
50. Diep B, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2006 Mar 4;367(9512):731-9.
51. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53(2):237-251.
52. Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, Karaolis DK, et al. Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus*. ATCC 25923. *Genome Announcements* 2014 Nov6;2(6).

## Capítulo II – Relatório dos Estágios

### 1. Estágio em Clínica Hospitalar

Este estágio decorreu no Hospital de Guimarães (Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, EPE), durante um período de 3,5 horas semanais, tendo iniciado no dia 17 de setembro de 2018 até o dia 14 de junho de 2019 sob a supervisão do Professor Dr. Fernando Figueira.

Tabela 4. Número de atos clínicos realizados como operador e assistente em todo o percurso no Estágio em Clínica Hospitalar.

Ato clínico	Operador	Assistente	Total
Dentisteria	23	17	40
Endodontia	14	-	14
Exodontia	30	24	54
Destartarização	15	16	31
Outros	9	5	14

### 2. Estágio em Clínica Geral Dentária

Este estágio decorreu na Clínica Filinto Batista, no Instituto Universitário de Ciências da Saúde – Gandra, com uma carga horária de 4 horas semanais, que decorreram à segunda- feira entre as 19:00 e 23:00, desde 17 de setembro de 2018 até 14 de junho de 2019. Em todo este período fomos supervisionados pela Professora Doutora Maria do Pranto.

Tabela 5. Número de atos clínicos realizados como operadora e assistente em todo o percurso no Estágio em Clínica Geral Dentária.

Ato clínico	Operador	Assistente	Total
Dentisteria	14	15	29
Endodontia	16	2	18

Exodontia	4	4	8
Destartarização	5	3	8
Outros	4	3	7

### 3. Estágio em Saúde Oral Comunitária

Este estágio decorreu no estabelecimento prisional Paços Ferreira e Hospital Santo Tirso, com uma carga horária de 3 horas semanais, que decorreram à segunda-feira entre as 9:00 e 12:00, desde 12 de novembro de 2018 até 14 de junho de 2019.

Tabela 6. Número de atos clínicos realizados como operadora e assistente em todo o percurso no Estágio em Saúde Oral Comunitária.

Ato clínico	Operador	Assistente	Total
Dentisteria	3	12	15
Endodontia	3	-	3
Exodontia	2	7	9
Destartarização	3	1	4
Outros	2	3	5

Foram realizados 6 projetos de estruturação e gerenciamento para o atendimento médico- dentário da comunidade:

- 1) Projeto Para Além das Grades: Projeto de Atenção à Saúde Oral no Estabelecimento Prisional Paços de Ferreira.

Neste projeto desenvolvi uma estratégia de atendimento com protocolos standardizados para garantir o direito de assistência médico-dentária mesmo com recursos financeiros reduzidos. Dessa forma, o custo por paciente é sabido, o que facilita o planeamento financeiro para obtenção de parcerias e incentivos. Esta estratégia recebeu o nome de “As 10 intervenções” e objetivam a adequação do meio oral, a prevenção e o diagnóstico precoce de lesões orais, especialmente as que tenham envolvimento com doenças sistémicas e transmissíveis (Figura 5).



Figura 5: As 10 intervenções. Descrição dos procedimentos que definem cada uma das dez intervenções.

2) Projeto Esperar a Aprender: Projeto de Intervenção Comunitária na Saúde Oral do Hospital da Misericórdia, Paredes.

Neste projeto objetivei a disseminação do conhecimento do processo de saúde/doença oral e de sua prevenção através de duas estratégias: a sala de espera interativa com jogos e vídeos educativos e, das receitas desenhadas onde doses, posologias e interações medicamentosas são explicadas com desenhos. O objetivo foi direcionar a informação sobre a saúde oral e prevenção de doenças a um grupo específico de indivíduos com baixa escolaridade. Mais uma vez propus a estratégia das 10 intervenções com protocolos clínicos *standardizados* para prevenção e tratamento de doenças orais; diagnóstico precoce de doenças orais e diagnóstico de manifestações orais de doenças com envolvimento sistémico em especial relacionados com as doenças

transmissíveis.

- 3) Projeto 1001 Razões para Sorrir: Este projeto foi um programa de saúde oral voltado para a população com dificuldade de locomoção. A mobilidade do atendimento foi proposta pela aquisição de uma Unidade Móvel de Atendimento pela Cespυ para promoção, prevenção, recuperação e manutenção da saúde oral das populações rurais em áreas isoladas ou de difícil acesso. O atendimento em massa seria realizado durante festas populares que ocorrem no Norte de Portugal. Foi desenvolvida uma estratégia geográfica alinhada com o calendário das festas populares das regiões alvo.

Os desafios 4-6 foram baseados nas conferências assistidas durante a IX Reunião da Sociedade de Odontopediatria de Portugal no dia 23-02-2019.

- 4) *Guidelines*: Patologias sistémicas com repercussão na cavidade oral.
- 5) *Guidelines*: Patologias benignas dos tecidos moles em Odontopediatria.
- 6) *Guidelines*: Patologias oral maligna na Odontopediatria.