



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DALLIANE OLIVEIRA SOARES

**ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS À
ADESÃO E AO FENÓTIPO DE VARIANTE DE PEQUENAS
COLÔNIAS EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE
INFECÇÃO ÓSSEA MAXILOFACIAL**

VITÓRIA, ES

2020

DALLIANE OLIVEIRA SOARES

**ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS À ADESÃO E
AO FENÓTIPO DE VARIANTE DE PEQUENAS COLÔNIAS EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE INFECÇÃO ÓSSEA
MAXILOFACIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Ventorin
Von Zeidler

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Paula
Ferreira Nunes

VITÓRIA, ES

2020

DALLIANE OLIVEIRA SOARES

**ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS À ADESÃO E AO
FENÓTIPO DE VARIANTE DE PEQUENAS COLÔNIAS EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE INFECÇÃO ÓSSEA MAXILOFACIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 21 de dezembro de 2020.

Prof. Dra. Sandra Ventrin Von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof. Dr. Daniel Cláudio O. Gomes
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador interno

Profa. Dr. André Luis Souza dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador externo

VITÓRIA, ES
2020

AGRADECIMENTOS

À UFES, por proporcionar ensino e pesquisa de qualidade gratuitamente.

À UFSB, por incentivar a educação continuada de seus servidores.

A minha orientadora, professora Dra. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler, pela oportunidade de trabalhar com essa pesquisa, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

A minha coorientadora professora Dra. Ana Paula Nunes, por toda orientação, atenção e ensinamentos compartilhados.

À professora Dra. Kênia Valéria dos Santos do Departamento de Patologia do CCS/UFES pela disponibilidade de amostras importantes para realização do trabalho.

Aos servidores técnicos em laboratório Steveen, Geraldo, Alex e Glaucia, por serem solícitos e sempre atenderem com alegria. Obrigada por todo o auxílio nos experimentos e por todo conhecimento transmitido.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares - UFES e Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio, por terem cedido diversas vezes a estrutura física e os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFES, eu agradeço imensamente pela oportunidade.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), (Código de Financiamento 001) e à Fundação de amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) por fomentar e viabilizar a execução deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Sou imensamente grato a Deus por me permitir ter sonhos e condições de torná-los reais. Este curso de mestrado é de grande importância para minha vida e para muitas pessoas que torcem por mim e se alegram com as minhas conquistas, a elas dedico este trabalho:

Meus pais Deusdeth e Rita, minha irmã Darlane, por todo amor, carinho e incentivo.

Tia Joana que nesse tempo foi minha rede de apoio na cidade, compartilhando comigo de muitos momentos difíceis e sempre tinha palavras de encorajamento para não desistir. Amo você.

Vó Maria pelas orações, sempre intercedendo por mim.

Ivana, Sheila e Karol, muito obrigada pela companhia, amizade e parceria na sala de aula.

Toda equipe do Laboratório de Patologia Molecular da UFES: Anna Clara Gregório por me ajudar nas extrações de DNA e por todo conhecimento compartilhado. Gabi, pela colaboração nos desenhos dos Primers. Camila, que me acolheu na república e sempre me ajudou no que foi preciso. Priscila, Thabata, Pâmela, Regina, Jéssica, Paola e Wilene, agradeço imensamente a todas vocês.

Toda equipe do Laboratório de Resistência Bacteriana (Resbac), em especial, Luiz Felipe por toda colaboração.

Thaise e Luan da UFSB, companheiros e colegas de trabalho, obrigada por me substituírem quando estive ausente e pelos incentivos em sempre continuar.

A todas as pessoas que conheci que fizeram crescer em mim o amor pela ciência, meus sinceros agradecimentos a todos!

" Que os nossos cansaços não vençam as nossas metas."

Wanderly Frota

RESUMO

SOARES, D.O. **Análise de fatores de virulência relacionados à adesão e ao fenótipo de variante de pequenas colônias em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção óssea maxilofacial.** 2020. 50f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A osteomielite é uma doença infecciosa que atinge o tecido ósseo e tem como agente etiológico mais frequente *Staphylococcus aureus*. Quando acomete a região maxilofacial acarreta significativo impacto à saúde, devido sua elevada morbidade, baixas taxas de cura e muitas vezes a necessidade de múltiplas cirurgias que podem levar a deformações e sequelas crônicas, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes, além de apresentar elevado custo hospitalar. Dessa forma, este estudo é importante, pois propõe-se a detectar os genes de virulência associados à expressão das adesinas de ligação ao colágeno tipo I (*cna*) e sialoproteína (*bbp*), além de verificar a capacidade de formação do fenótipo SCVs (do inglês *small colony variants*) de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de osteomielite maxilofacial e de portadores nasais assintomáticos. Foram analisadas 12 cepas de *S. aureus*, sendo 6 isoladas de osteomielite maxilofacial e 6 de portadores nasais assintomáticos. Para identificação bacteriana foram usados testes fenotípicos como: análise morfotintorial, teste de coagulase, catalase e fermentação em ágar manitol. Pressão seletiva com uso de antibiótico gentamicina foi utilizada para identificação do fenótipo SCVs e amplificação dos genes das adesinas *cna* e *bbp* por meio da técnica de PCR. Nossos resultados mostraram que genes de virulência associados à expressão de adesinas *bbp* e *cna* não foram determinantes para o estabelecimento de infecções ósseas considerando as cepas analisadas de *Staphylococcus aureus* isoladas de osteomielite maxilofacial e de portadores nasais assintomáticos, sugerindo que outros mecanismos estejam envolvidos neste processo, como a manifestação do fenótipo SCV, o qual mostrou ter papel importante no estabelecimento e persistência das osteomielites supurativas crônicas.

Palavras-chave: Infecção óssea maxilofacial. SCVs. Adesinas *bbp* e *cna*.

ABSTRACT

SOARES, D.O. **Analysis of virulence factors related to adherence and the small colonies variant phenotype in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from maxillofacial bone infection.** 2020. 50f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Osteomyelitis is an infectious disease that affects bone tissue and has the most frequent etiologic agent *Staphylococcus aureus*. Osteomyelitis in the maxillofacial region has a significant impact on oral health in developing countries, has high morbidity, low cure rates and often the need for multiple surgeries that can lead to deformations and chronic sequelae, compromising the quality of life of patients, in addition to high hospital cost. Thus, this study is important, as it is proposed to elucidate some mechanisms involved in the pathogenesis of maxillofacial osteomyelitis. The aim of this study was to compare strains of *Staphylococcus aureus* isolated from maxillofacial osteomyelitis and asymptomatic nasal carriers for the detection of virulence genes associated with the expression of type I collagen-binding adhesives (*cna*) and sialoprotein (*bbp*), in addition to ability to form the SCVs phenotype (small colony variants). Twelve strains of *S. aureus* were analyzed, 6 isolated from maxillofacial osteomyelitis and 6 from asymptomatic nasal carriers. For bacterial identification, phenotypic tests were used, such as: morphotintorial analysis, coagulase test, catalase and fermentation in mannitol agar. Selective pressure with the use of gentamicin antibiotic was used to identify the SCVs phenotype and amplify the adhesin genes *cna* and *bbp* using the PCR technique. Our results showed that virulence genes associated with the expression of adhesins *bbp* and *cna* were not determinants for the establishment of bone infections considering the analyzed strains of *Staphylococcus aureus* isolated from maxillofacial osteomyelitis and asymptomatic nasal carriers, suggesting that other mechanisms are involved in this process, as the manifestation of the SCV phenotype, which has shown to play an important role in the establishment and persistence of chronic suppurative osteomyelitis.

Keywords: Maxillofacial bone infection. SCVs. Adesinas *bbp* and *cna*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Adesinas expressas por *Staphylococcus aureus* responsáveis pela adesão da bactéria aos componentes da matriz óssea. (A) célula osteoblástica com presença da Integrin $\alpha 5\beta 1$ acoplada à membrana da célula; (B) componentes da matriz óssea extracelular; (C) *S. aureus*; (*Cna*) adesina de ligação ao colágeno; (*Bbp*) adesina de ligação a sialoproteína; (FnBPA/B) adesina de ligação a fibronectina A e B. Fonte: Adaptado de JOSSE *et al.*, 2015.19
- Figura 2.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma sequência de eventos de adesão e internalização de *Staphylococcus aureus* em células osteoblásticas: (A) Cepa fora célula e início da formação de prolongamento citoplasmático; (B) Prolongamentos envolvendo a cepa; (C) Internalização da cepa no osteoblasto; (D) Cepa em divisão celular..... 22
- Figura 3.** Sistema RANK-RANKL-OPG no processo de regulação da osteoclastogênese e reabsorção óssea.....23
- Figura 4.** Fluxograma do experimento de pressão seletiva com gentamicina para identificação de cepas formadoras de SCVs.....30
- Figura 5.** Testes fenotípicos em amostras de *Staphylococcus aureus*. (A) cultura em meio Ágar Sangue com presença de hemólise; (B) Imagem microscópica *S. aureus* com coloração de Gram; (C) Presença de coágulo no teste de coagulase em tubo.....32
- Figura 6.** Teste disco-difusão com cefoxitina, apresentando zona de inibição maior que 22 mm ao redor do disco.....34
- Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes de virulência *cna* e *bbp*. Os amplicons correspondentes a cada amostra, obtidos em PCR independentes, foram inseridos na mesma lane para visualização, tanto nos controles quanto nas amostras (1 a 12). Marcador de peso molecular 100 pb; (CP) controle positivo ATCC 25923; (CN) controle negativo; 1, 2, 3, 4, 5 e 6, cepas provenientes osteomielite maxilofacial; 7, 8, 9, 10, 11 e 12, cepas de portadores nasais.35
- Figura 8.** Cultura de *Staphylococcus aureus* exibindo fenótipo sugestivo de SCV (do inglês *small colony variants*). (A) cultura em meio ágar sangue sem gentamicina; (B) cultura em meio ágar sangue com 1µg/mL de gentamicina; Seta azul: supostas colônias SCVs; Seta verde: colônias parentais.....36
- Figura 9.** Capacidade de reversão do fenótipo SCV (do inglês *small colony variants*) dos isoladas de *S. aureus*: (A) permaneceu sem alteração de fenótipo; (B) ocorreu reversão de forma parcial, sendo observados dois tipos de colônias;(C) todas as colônias voltaram ao tamanho padrão.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado dos testes fenotípicos e genotípicos de amostras clínicas de pacientes e portadores assintomáticos	33
Tabela 2. Associação entre a detecção dos genes das adesinas <i>cna</i> e <i>bbp</i> e expressão do fenótipo SCV em <i>S. aureus</i> isolados de osteomielite maxilofacial e de portadores assintomáticos.....	36
Tabela 3. Resultado do ensaio da análise de fenótipo SCV.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - Coleção Americana de Culturas (do inglês *American Type Culture Collection*)

CIM - concentração inibitória mínima

DNA - ácido desoxirribonucleico

HA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido em hospital (do inglês *hospital-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus*)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicillin resistant Staphylococcus aureus*)

MSCRAMMs – componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz (do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*)

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (do inglês *methicillin sensitive Staphylococcus aureus*)

RANK - Receptor ativador nuclear kappa B,

RANK-L - ligante do receptor ativador nuclear kappa B

OPG - osteoprotegerina

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*) .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 OSTEOMIELEITE MAXILOFACIAL	16
2.2 PATOGÊNESE DA OSTEOMIELEITE MAXILOFACIAL CAUSADA POR <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.3 PEQUENAS VARIANTES DE COLÔNIAS (SCVS)	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR	27
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A B-LACTÂMICOS	28
4.4 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DAS ADESINAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO TIPO I E SIALOPROTEÍNA.	29
4.5 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DE PEQUENAS COLÔNIAS (SCVS)	30
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas estão entre as mais importantes causas de morte humana no mundo (GUO *et al.*, 2020). A taxa de mortalidade quando a infecção ocorre de forma sistêmica é superior a 50%, o que tem contribuído para que estas infecções tenham se tornado um problema mundial no tratamento clínico e comunitário anti-infeccioso (GUO *et al.*, 2020). As osteomielites fazem parte desse grupo de doenças infecciosas onde o tecido ósseo é afetado, tendo como principal agente etiológico o *Staphylococcus aureus*, responsável por 30% a 75% dos casos que ocorrem em humanos (KAVANAGH *et al.*, 2018; HOFSTEE *et al.*, 2020). Os ossos mais frequentemente acometidos são os ossos longos dos membros, como fêmur e úmero, e ossos da coluna vertebral, mas qualquer região do sistema esquelético pode ser acometida. Na região maxilofacial, a mandíbula é o osso mais afetado (SCHLUND *et al.*, 2017).

A osteomielite na região maxilofacial acarreta sérias consequências relacionadas à cronificação da infecção trazendo significativo impacto à saúde bucal nos países em desenvolvimento. Combater essas infecções é uma tarefa difícil devido à natureza microbiana, anatomia do osso afetado e estado fisiológico do paciente, podendo ser agravada principalmente em indivíduos que apresentam comorbidades como Diabetes Mellitus, desnutrição, câncer ou deficiência imunológica (ZIMMERMANN *et al.*, 2020). Dessa forma, a osteomielite maxilofacial apresenta alta morbidade trazendo dentre outras complicações, muitas vezes a necessidade de múltiplas cirurgias que podem levar a deformações e sequelas crônicas, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes, além de apresentar elevado custo hospitalar para o tratamento adequado e apresentar baixas taxas de cura (TUCHSCHERR *et al.*, 2016).

A osteomielite na região maxilofacial comumente tem início a partir de lesões traumáticas, ou por disseminação hematogênica, proporcionando que os *S. aureus* alcancem o tecido ósseo. Infecções odontogênicas também podem contribuir para a disseminação bacteriana no tecido ósseo, embora menos comumente estas evoluam para osteomielites, uma vez que *S. aureus* não está entre os

microrganismos mais frequentemente encontrados nas infecções dentárias (ZIMMERMANN *et al.*, 2020).

S. aureus faz parte da microbiota de indivíduos saudáveis, podendo ser encontrados em aproximadamente 30% da população em geral. Por outro lado, é considerado patógeno de grande importância clínica por estar envolvido em diversas infecções tanto em indivíduos hospitalizados quanto comunitários (LEE *et al.*, 2020), principalmente em infecções ósseas, devido a sua alta versatilidade pela diversidade de fatores de virulência e mecanismos de resistência a antimicrobianos. Infecções ósseas por esta espécie requer um tratamento prolongado e por vezes difícil, sobretudo porque, desde o advento da quimioterapia antibacteriana, esta espécie tem conseguido tornar-se resistente a praticamente todos os agentes antimicrobianos já desenvolvidos (KAVANAGH *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018).

A patogênese das infecções ósseas causadas por *S. aureus* está relacionada a uma combinação de fatores extracelulares e propriedades de aderência bacteriana. Esta espécie possui em sua superfície diferentes moléculas de adesão capazes de ligarem-se de forma específica a componentes da matriz extracelular. Estas moléculas de adesão são componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz, conhecidas pela sigla MSCRAMMs (do inglês, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Dentre as que apresentam papel mais relevante no processo patológico das osteomielites, podemos citar: adesina de ligação ao colágeno (cna), fibronectina de ligação A e B (finbA, finbB) e sialoproteína (bbp) (ATSHAN *et al.*, 2012). As MSCRAMMs possibilitam a adesão de *S. aureus* à matriz extracelular do tecido ósseo, uma etapa fundamental para o estabelecimento da infecção, além de auxiliarem no processo de internalização celular. Deste modo, a expressão destas adesinas aumentam a capacidade de infecção, além de contribuírem para que estas tornem-se (se tornem) crônicas e persistentes (FOSTER *et al.*, 2014).

Adicionalmente, nas últimas décadas, infecções ósseas crônicas e recorrentes têm sido associadas a um fenótipo alterado de *S. aureus*, conhecido como variantes de pequenas colônias (SCVs, do inglês *small colony variants*) (TUCHSCHERR *et al.*, 2016). Este fenótipo é caracterizado pela formação de colônias pequenas, não pigmentadas e não hemolíticas, e que, devido à morfologia atípica e perfil

bioquímico incomum, comumente levam ao diagnóstico tardio (DELGADO-VALVERDE et al., 2014). As SCVs têm metabolismo mais lento e capacidade de manter-se por longos períodos em estágio de latência, podendo persistir dentro das células do hospedeiro, onde favorece os mecanismos de evasão ao sistema imune e também à ação dos antimicrobianos. Estas características potencialmente dificultam o tratamento e reduzem as possibilidades de cura (YANG *et al.*, 2018).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa investigaram a participação de fatores de virulência de *S. aureus* isolados de pacientes com infecções ósseas da região maxilofacial, comparados a portadores orais, onde foram identificados fatores de virulência associados à adesão ao colágeno e indução da internalização nos osteoblastos cultivados (VON ZEIDLER, 1999). A partir deste estudo, observou-se a necessidade de investigar a presença de perfis fenotípicos de virulência, como as SCVs e a presença de genes de adesão bacteriana, sendo esses importantes por contribuir para a patogênese da osteomielite maxilofacial. Experimentos realizados com cepas isoladas de pacientes com infecções ósseas e com portadores assintomáticos são relativamente escassos na literatura. Dessa forma, consideramos que o estudo de mecanismos de virulência de *S. aureus* presentes neste estudo podem auxiliar no esclarecimento da iniciação e progressão dos processos infecciosos que acometem a região maxilofacial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OSTEOMIELOITE MAXILOFACIAL

O tecido ósseo é composto por uma variedade de células, como osteoblastos, osteócitos, e osteoclastos, dispostos em uma matriz extracelular formada por componentes orgânicos e inorgânicos. O principal componente orgânico da matriz extracelular é o colágeno tipo I, que corresponde a 90% do total de proteínas e tem como função manter a estabilidade e elasticidade do tecido, atuando também na modulação do comportamento celular (BENTO, 2003; KAVANAGH *et al.*, 2018). A matriz óssea também é composta por proteínas não-colágenas, como fibronectinas, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína, metaloproteinases de matriz e fatores de crescimento. Os componentes inorgânicos, por sua vez, conferem rigidez e resistência ao tecido ósseo e são constituídos principalmente por cristais de hidroxiapatita na forma de fosfato de cálcio (BENTO, 2003).

A osteomielite é a principal doença infecciosa que atinge o tecido ósseo, promovendo um processo patológico longo e muitas vezes grave. Pode ser causada por fungos ou bactérias, sendo *S. aureus* o agente etiológico mais frequente, envolvido em cerca de 30 a 75% dos casos (SUN HAI-JIANG *et al.*, 2016). A infecção pode ocorrer de forma primária ou secundária. A osteomielite primária ocorre quando há contato direto de material contaminado ou do ambiente externo com o tecido ósseo, sendo mais frequentemente ocasionados por acidentes ou intervenções cirúrgicas, onde, por um trauma físico há exposição, osteotomia ou fratura óssea. Já a osteomielite de origem secundária, pode ser proveniente da disseminação hematogênica do microrganismo ou do contato com tecidos moles adjacentes, a partir de uma infecção pré-existente (KAVANAGH *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da osteomielite na região mandibular está relacionado a fatores de virulência bacteriana, bem como a fatores intrínsecos do hospedeiro, como resposta imunológica, circulação sanguínea local devido às placas corticais serem pobremente vascularizadas e fatores sistêmicos (KUDVA *et al.* 2018). Os fatores sistêmicos que favorecem a instalação dos quadros infecciosos incluem Diabetes

Mellitus, doença autoimune, desnutrição grave, anemia e uso de hormônios, os quais podem reduzir a capacidade de resposta imunológica do hospedeiro. Os fatores que alteram a circulação sanguínea predispondo os indivíduos à osteomielite mandibular, por sua vez, incluem radioterapia em região de cabeça e pescoço, osteoporose, osteopetrose e displasia óssea fibrosa (SUN HAI-JIANG *et al.*, 2016).

Pacientes com osteomielite podem apresentar sintomas clínicos como dor, inchaço, drenagem purulenta, fístulas e/ou presença de sinusite nos seios da face, ruptura da ferida, eritema, aumento da temperatura local. Além disso, os seguintes parâmetros são considerados: i) sinais de destruição óssea e a presença de sequestro e coleção purulenta em tecido mole avaliada por exames de imagem; ii) ocorrência de microrganismos em mais de uma amostra profunda verificada com culturas microbiológicas, e iii) contagem de leucócitos, taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR) e dos níveis de proteína C reativa (PCR). A infecção pode ser confirmada por meio de cultura ou por exame histopatológico de amostras de tecido profundo, sendo a presença de microrganismos no tecido profundo identificado utilizando-se as técnicas de coloração específicas para bactérias (por exemplo, coloração de Gram). Para os casos em que o resultado da cultura é negativo, o diagnóstico das osteomielites pode ser confirmado histologicamente se houver sinais de reabsorção e remodelação óssea ativa, e a presença de processo inflamatório agudo ou crônico. O infiltrado de células inflamatórias agudas é demonstrado pela identificação de mais de cinco polimorfonucleares (PMNs) por campo de alta potência no aumento x400 (TIEMANN *et al.*, 2014).

O tratamento convencional para osteomielite crônica do complexo maxilofacial consiste no desbridamento cirúrgico do osso necrótico infectado e terapia antimicrobiana sistêmica. Os antimicrobianos frequentemente usados para tratar a osteomielite por *S. aureus* incluem β -lactâmicos associados a inibidores da enzima β -lactamase, clindamicina e fluoroquinolonas. Vancomicina, linezolida, daptomicina e fosfomicina são indicadas quando detectada presença de cepas resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) (TUCHSCHERR *et al.*, 2016; VESTERGAARD *et al.*, 2019).

2.2 PATOGÊNESE DA OSTEOMIELEITE MAXILOFACIAL CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS aureus*

Nossa compreensão da fisiopatologia da osteomielite evoluiu nos últimos anos e agora temos uma visão melhor de que a cronicidade pode estar relacionada à formação de biofilme bacteriano e invasão bacteriana dentro do sistema canalicular dos osteócitos estão envolvidas nas osteomielites crônicas.

A osteomielite é tipicamente de origem bacteriana, notavelmente espécies de *Staphylococcus*, em que *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais predominante, envolvidos em infecções hospitalares ou comunitárias, como abscesso cutâneo, pneumonia ou artrite séptica, além de ter papel relevante nas infecções ósseas (LEW E WALDVOGEL, 2004).

S. aureus são caracterizados por apresentar formato cocos com aproximadamente 0,8 µm de diâmetro, Gram-positivo, dispostos de forma semelhante a cachos de uvas sob microscopia e crescem de maneira ideal a 37° C em pH 7,4. São saprófitas, fazendo parte da microbiota humana normal e colonizando diversas partes do corpo, como fossas nasais, orofaringe, intestinos e pele. No entanto, apresentam potencial patogênico, sendo versáteis em adquirir genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, o que lhe confere um papel de destaque entre os microrganismos de interesse médico devido à sua capacidade de causar uma variedade de infecções (YANG *et al.*, 2018).

Como patógeno na osteomielite maxilofacial, *S. aureus* consegue acessar o espaço medular do osso por diferentes mecanismos, sendo a via hematogênica e as lesões traumáticas os mais comuns. Também é possível sua disseminação pelos tecidos moles ou implantes metálicos. Esta espécie utiliza vários mecanismos de virulência que fazem com que consiga escapar das barreiras mecânicas, químicas e resposta imunológica do hospedeiro, facilitando a invasão ao tecido ósseo (JOSSE *et al.*, 2015). Dentre os mecanismos de evasão ao sistema imune, podemos citar o uso da cápsula para neutralizar a fagocitose e a opsonização pelo sistema complemento. Outro aspecto importante da virulência de *S. aureus* está em sua capacidade de atingir a membrana celular com um grande número de toxinas e peptídeos estimulando a resposta inflamatória (VELÁZQUEZ-MESA, 2005).

Outro evento crítico no processo de invasão bacteriana é a expressão de proteínas de adesão a componentes da matriz extracelular, o que confere um importante papel na patogenicidade de vários processos infecciosos (MADANI *et al.*, 2017). *S. aureus* apresenta inúmeras MSCRAMMs, que são moléculas de adesão presentes na superfície bacteriana, como a proteína A estafilocócica (*SpA*), a proteína ligante de fibronectina (*FnBP*), proteína de ligação à sialoproteína óssea (*Bbp*) (Salman *et al.*, 2012) e proteína ligante de colágeno (*cna*) (FOSTER *et al.* 2014), conforme ilustrado na figura 1. Dessa forma, assim que *S. aureus* tem acesso ao espaço medular do osso utiliza suas MSCRAMMs para se aderir de forma específica às proteínas da matriz óssea extracelular, às proteínas plasmáticas e aos osteoblastos (KAVANAGH *et al.*, 2018).

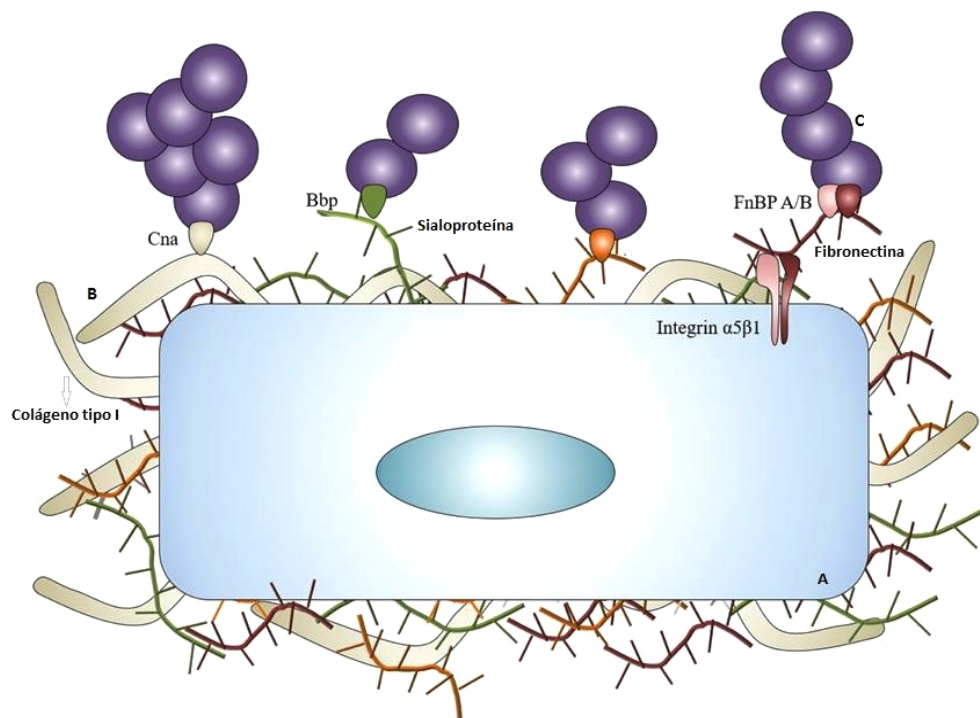


Figura 1. Adesinas expressas por *Staphylococcus aureus* responsáveis pela adesão da bactéria aos componentes da matriz óssea. (A) célula osteoblástica com presença da Integrin $\alpha 5\beta 1$ acoplada à membrana da célula; (B) componentes da matriz óssea extracelular; (C) *S. aureus*; (Cna) adesina de ligação ao colágeno; (Bbp) adesina de ligação a sialoproteína; (FnBPA/B) adesina de ligação a fibronectina A e B. Fonte: Adaptado de JOSSE *et al.*, 2015.

Os fatores de patogenicidade mais importantes relacionados às infecções ósseas são as adesinas de ligação ao colágeno tipo I, sialoproteína óssea e fibronectina. O colágeno tipo I representa a maior parte da porção orgânica do osso, sendo assim um importante componente no processo de patogênese da osteomielite, por representar um grande volume de substrato disponível para a adesina de ligação ao colágeno (*cna*) presente na superfície de *S. aureus*. Além disso, cepas *cna*-positivas são frequentemente associadas à formação de biofilmes, uma característica que aumenta a patogenicidade de *S. aureus* em osteomielite associadas a materiais implantados no tecido ósseo (JOSSE *et al.*, 2015). As sialoproteínas, por sua vez, são proteínas da matriz extracelular que se ligam à hidroxiapatita por meio de sequências de ácido poliglutâmico, mediando assim a adesão de células via sequência de aminoácidos tripeptídeo ácido arginil-glicil-aspartico. A proteína ligante da sialoproteína (*Bbp*) foi uma das primeiras adesinas estudadas na osteomielite causada por *S. aureus*. Dessa forma, tanto o *Cna* quanto o *Bbp* são considerados importantes marcadores de virulência em *S. aureus* isolados de osteomielite associada a implantes (SANTOS *et al.*, 2007) e, por isso, foram selecionadas para serem alvos de investigação neste estudo.

A fibronectina faz parte de uma família de glicoproteínas de elevado peso molecular, contendo cerca de 5% de carboidratos, que liga-se a receptores protéicos da membrana celular chamados integrinas e também à matriz extracelular (Figura 1). É o componente mais estudado da matriz extracelular na infecção estafilocócica, principalmente na osteomielite, onde atua como uma ponte entre *S. aureus* e os osteoblastos, colaborando para o processo de internalização de *S. aureus*. (ATSHAN *et al.*, 2012).

Este é outro mecanismo importante da patogenicidade de *S. aureus* nas osteomielites para o processo de internalização em osteoblastos. Acredita-se que a forma mais comum de internalização de *S. aureus* em osteoblastos ocorra por meio das fibronectinas, as quais são usadas como “pontes” entre a FnBP, expressa por *S. aureus*, e a integrina $\alpha 5\beta 1$ presente na superfície dos osteoblastos (CLARO *et al.*, 2011). Dessa forma, outros componentes da matriz óssea extracelular, como colágeno e sialoproteína, também se ligam a múltiplas integrinas, o que poderia possibilitar que os sistemas de pontes “integrinas/MSCRAMM”, ainda não

completamente esclarecidos, possam iniciar a internalização de *S. aureus* em osteoblastos (JOSSE *et al.*, 2015).

A ligação com as integrinas leva à internalização da bactéria pela formação de vesículas fagocíticas (Figura 2). Após este processo, dois eventos podem ocorrer: a indução da morte dos osteoblastos ou a permanência destas bactérias na célula. (STROBEL *et al.*, 2016).

A permanência de *S. aureus* intracelularmente está ligada à sua capacidade de escapar dos fagossomos, o que se deve à ação de outros fatores de virulência, como as enzimas hemolisinas, leucocidinas bicomponentes e modulinas solúveis em fenol que danificam a membrana do fagossomo. Outro mecanismo relacionado à permanência de *S. aureus* no osteoblasto é o fenótipo SCV, que será melhor discutido adiante (CLARO *et al.*, 2011; STROBEL *et al.*, 2016).

Utilizando modelos *in vitro* foi observado que primeiramente *S. aureus* se ligam à matriz óssea extracelular para iniciar sua interação com os osteoblastos. A internalização de *S. aureus* pelo osteoblasto é um elemento chave na progressão das osteomielites. Este processo permite que a bactéria fique viável e persista dentro dos osteoblastos, evadindo à resposta imunológica do hospedeiro e à ação de antimicrobianos, garantindo assim a continuidade e disseminação da infecção. Este mecanismo também pode explicar as infecções recorrentes observadas na osteomielite (JOSSE *et al.*, 2015). A presença de *S. aureus* viável intracelularmente é um importante problema nas osteomielites, uma vez que, em geral, leva à evolução para a forma crônica da doença, agravando a infecção, e dificultando o tratamento adequado, como já demonstrado por estudos anteriores realizados por nosso grupo, conforme mostrado na figura 2 (VON ZEIDLER, 1999).

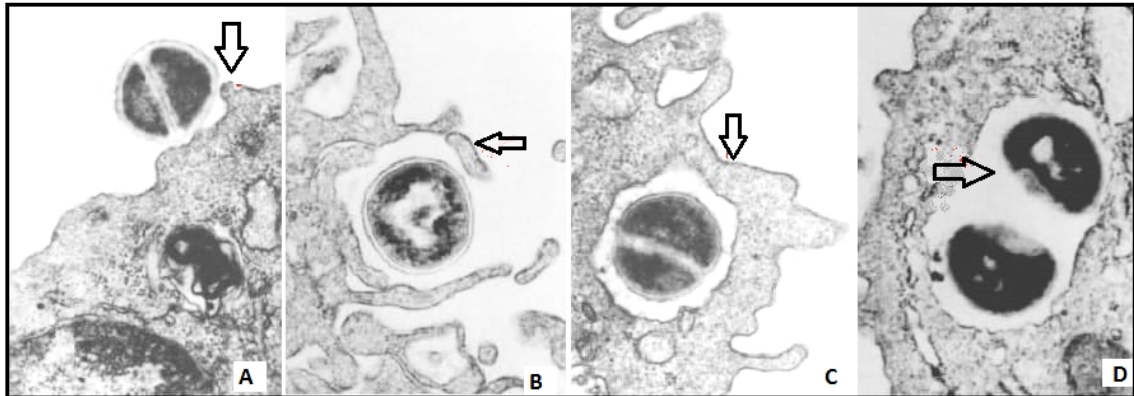


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma sequência de eventos de adesão e internalização de *Staphylococcus aureus* em células osteoblásticas: (A) Cepa fora da célula e início da formação de prolongamento citoplasmático; (B) Prolongamentos envolvendo a cepa; (C) Internalização da cepa no osteoblasto; (D) Cepa em divisão celular. Fonte: Adaptado de VON ZEIDLER, 1999.

A interação entre *S. aureus* e osteoblastos induz a resposta inflamatória levando à produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento pelos osteoblastos e células inflamatórias. Além da reação inflamatória, a infecção por *S. aureus* pode levar à morte dos osteoblastos por necrose ou apoptose e desequilíbrio na homeostase óssea devido ao aumento da reabsorção óssea (ATSHAN *et al.*, 2012; JOSSE *et al.*, 2015).

Uma vez aderido ao tecido, *S. aureus* utiliza estratégias de sobrevivência para evadir a resposta imunológica, dentre elas a internalização em osteoblastos. Também utiliza mecanismos de protetivos contra os efeitos das terapias antimicrobianas, como a agregação e formação de microcolônias, que também são conhecidas como comunidades de abscesso estafilocócico (HOFSTEE *et al.*, 2020). Além disso, algumas cepas são capazes de mudar para o fenótipo SCV, como será discutido posteriormente, permitindo sua sobrevivência sob condições de estresse, e contribuindo para a cronicidade e reincidência da doença (OU JJ *et al.*, 2016).

O processo de desequilíbrio da homeostase óssea provocada pela infecção bacteriana contribuirá para a desregulação do funcionamento do sistema de remodelação óssea, denominado RANK-RANKL-OPG, o qual é constituído pela

proteína RANK, o seu respectivo ligante RANKL e a osteoprotegerina (SUNDEEP KHOSLA, 2001; SCHLUND *et al.*, 2017; BRAZ-SILVA, *et al.*, 2019) (Figura 3).

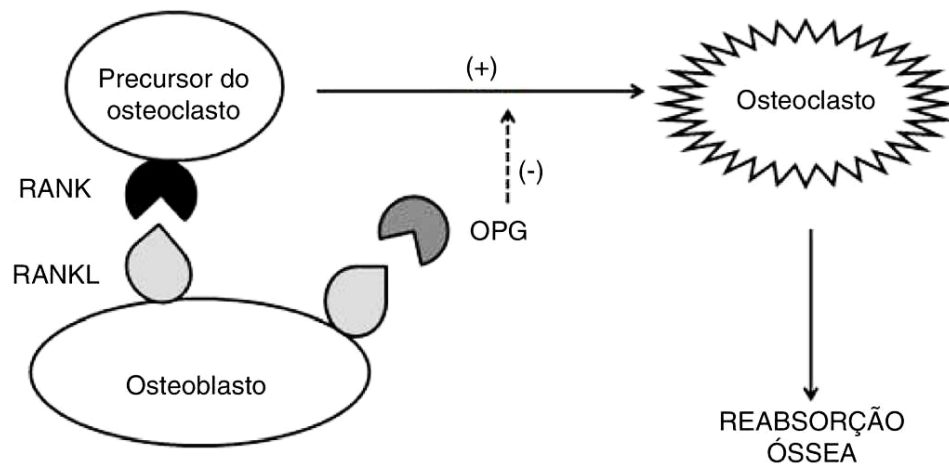


Figura 3. Sistema RANK-RANKL-OPG no processo de regulação da osteoclastogênese e reabsorção óssea. Fonte: Adaptado de FERREIRA PV *et al.*, 2019.

O RANK está expresso em altos níveis em células precursoras de osteoclastos, e o RANKL, que é seu ligante, é secretado por vários tipos celulares, especialmente os osteoblastos. Quando ocorre a ligação entre o RANK e o RANKL na superfície das células pré-osteoclásticas será permitida a diferenciação destas células em osteoclastos, o que resultará na ativação do processo de osteoclastogênese (HOFSTEE *et al.*, 2020). A OPG, que também é secretada pelos osteoblastos, exercem um efeito inibitório na sobrevivência dos osteoclastos pois inibe o processo de reabsorção óssea quando se liga a RANKL e, por competição, impedirá que este se ligue ao seu receptor, o RANK, evitando o processo de osteoclastogênese e, portanto, reduzindo a capacidade de reabsorção óssea (MACHADO, LINGORDO, 2015; BRAZ-SILVA, *et al.*, 2019).

2.3 PEQUENAS VARIANTES DE COLÔNIAS (SCVs)

As SCVs (do inglês *small colony variants*) de *S. aureus* são caracterizadas por apresentarem colônias de tamanho reduzido (aproximadamente dez vezes menor que uma colônia parental), metabolismo mais lento, pouca ou ausente total de hemólise e reduzida atividade da coagulase (TUCHSCHERR *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018). Devido a essas características, estudos indicam que as SCVs conseguem resistir internamente nos osteoblastos, tornando-se menos sensíveis à ação dos antimicrobianos e com capacidade para escapar da resposta imune do hospedeiro, o que torna a cepa com essa característica fenotípica ainda mais patogênica (LEE *et al.*, 2020).

A invasão intracelular provocada por SCVs induz uma regulação menos difundida dos fatores pró-inflamatórios e de remodelação tecidual em comparação com a invasão intracelular por cepas de *S. aureus* selvagens. Esses achados reforçam a visão atual de que os SCVs são capazes de evadir aos mecanismos de detecção exercidos pelas células do sistema imune do hospedeiro, permitindo assim, sua sobrevivência (OU JJ *et al.*, 2016; VALOUR *et al.*, 2015).

Assim, *S. aureus* com a presença dessas subpopulações quase inativas, tolerantes aos antimicrobianos e capazes de evitar a resposta imune do hospedeiro, tem colaborado para agravar o quadro das infecções, possibilitando que essas sejam recorrentes e de difícil resolução. As SCVs têm capacidade de reverter rapidamente o fenótipo voltando para sua forma normal, não-SCV, e em condições de laboratório, sua caracterização tem sido dificultada, por este motivo, pois embora tenha muitos estudos relacionados a SCV, permanecem nuances desconhecidas em seu desenvolvimento e capacidade de reversão para as formas tradicionais de colônia de *S. aureus*. (KAVANAGH *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar entre amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de osteomielite maxilofacial e de portadores nasais assintomáticos a detecção dos genes associados à expressão das adesinas *cna* e *bbp* e verificar a capacidade de formação do fenótipo SCVs (do inglês *small colony variants*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação morfológica e bioquímica de cepas de *S. aureus* isolados de pacientes com osteomielite maxilofacial e de portadores nasais;
- Detectar a presença do gene *nuc* para confirmação das amostras de *S. aureus* selecionadas;
- Avaliar as cepas de *S. aureus* quanto à resistência aos β -lactâmicos;
- Investigar a presença dos genes associados à expressão de adesinas *cna* e *bbp*;
- Avaliar as cepas de *S. aureus* quanto à capacidade de apresentarem o fenótipo SCV (do inglês *small colony variants*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram incluídas no estudo, seis cepas de *S. aureus* isoladas de infecção óssea maxilofacial originadas de processos infecciosos decorrentes de lesões traumáticas ou secundárias à cirurgia para colocação de material de contenção e fixação ósseas, como fios de aço e miniplacas de titânio, em pacientes atendidos no Setor de Cirurgia Buco-Maxilofacial e Traumatologia do Hospital Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo período de 1998 a 1999. Estas cepas foram obtidas a partir de estudo prévio aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de São Paulo, tendo recebido apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 97/13429-0 (VON ZEIDLER, 1999).

Outras 06 cepas de *S. aureus* provenientes de portadores nasais assintomáticos foram incluídas no estudo. Estas cepas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Kênia Valéria dos Santos - Laboratório de Microbiologia Geral e Clínica do Departamento de Patologia do CCS/UFES e foram provenientes do estudo intitulado “Determinação do status de portador nasal de *S. aureus* dos pacientes sob hemodiálise em uma Unidade de Diálise de Cariacica, ES”, aprovado no comitê de ética sob Parecer número 903.453.

As cepas comerciais de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR

As cepas de *S. aureus* foram subcultivadas em meio ágar sangue a 37°C por 24 horas. Após, foi realizada a confirmação da espécie bacteriana por meio da observação morfológica das colônias pelo método da avaliação morfotintorial pelo método de Gram e do perfil bioquímico por meio dos testes de fermentação em ágar manitol, teste da catalase e teste da coagulase em lâmina e tubo (VERMELHO *et al.*, 2006).

Para extração de DNA, as colônias de *S. aureus* cultivadas em ágar sangue a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, foram suspensas em água Milli-Q® até uma concentração correspondente a 4 da escala McFarland, equivalente a aproximadamente 12×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. DNA bacteriano proveniente dessa suspensão foi extraído utilizando DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, EUA, catálogo n° 12224-50), de acordo com as instruções do fabricante, excluindo-se a etapa 7, a qual previa a adição da solução IRS, que foi eliminada para garantir a obtenção de uma quantidade maior de DNA.

Todas as cepas que apresentaram perfil bioquímico típico de *S. aureus* foram submetidas à confirmação molecular por meio da detecção do gene *nuc* pela técnica de PCR convencional, utilizando os oligonucleotídeos descritos por MOURA *et al.* (2018), com as seguintes sequências: iniciadores forward: TCA GCA AAT GCA TCA CAA ACAG e reverse: CGT AAA TGC ACT TGC TTC AGG, gerando um amplicon com 279 pares de base (pb).

O sistema GoTaq® DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) foi utilizado para preparação da mistura de reação no volume final de 25 µL, contendo: 5µL de tampão; 0,5µL de dNTP, 1µL de cada Primer F e R (10 mM); 0,125 µL de GoTaq® DNA Polymerase; 1µL de MgCl₂ (25 mM); e 5µL de DNA bacteriano, correspondente a 100 ng. O restante do volume foi completado com água ultrapura.

As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA, modelo 2720) de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C; anelamento a 50°C por 1

minutos e extensão a 72°C por 1 minuto. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) 1,0 % corados com gel red (Biotium®), DNA Ladder 100 pb (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (marca DNR Systems Imaging-Bio, modelo MoniBis Pro).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A β -LACTÂMICOS

A identificação de cepas sensíveis ou resistentes aos β -lactâmicos podem ser feitas através do uso de técnicas microbiológicas de acordo com critérios estabelecidos pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), como o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), avaliando-se os halos de inibição em disco-difusão. Para prever a resistência à oxacilina foi realizado o teste de sensibilidade a cefoxitina (CFO) (BrCast 2019). As amostras foram cultivadas em ágar sangue a 37°C por 24 horas. Após este período, com auxílio de alça bacteriológica, colônias foram transferidas para um tubo contendo salina estéril até formar uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland, correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Utilizando esta suspensão bacteriana, realizou-se a semeadura com swab em ágar Müller-Hinton e logo após, o disco de CFO 30µg, foi colocado no centro da placa. As placas foram então incubadas a 37°C $\pm$ 2 por 24 horas. O resultado do teste foi obtido através da medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento, sendo as amostras que apresentaram halos com diâmetro $\geq$ 22 mm classificadas como sensíveis aos β -lactâmicos. A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

4.4 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DAS ADESINAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO TIPO I E SIALOPROTEÍNA.

Com a finalidade de investigar a presença dos genes de virulência *cna* e *bbp*, que são adesinas de ligação ao Colágeno Tipo I e sialoproteína respectivamente, nas amostras de *S. aureus*, foram realizadas PCRs conforme descrito por MOTALLEBI *et al.* (2016) e ATSHAN *et al.* (2012). As sequências oligonucleotídeos usadas para o gene *cna* foram F: GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC e R: AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG; e para o gene *bbp* foram F: AACTACATCTAGTACTCAACAACAG e R: TGTGCTTGAATAACACCATCATCT, gerando amplicons com 423 e 574 pb, respectivamente.

As condições da reação foram as mesmas para ambos os genes. Utilizou-se o sistema GoTaq® DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) para preparação da mistura de 25µL volume final, contendo: 5µL de tampão; 0,5µL de dNTP, 1µL de cada oligonucleotídeo (10 mM); 0,125µL GoTaq® DNA Polymerase; 1µL de MgCl₂ (25 mM) e 5µL de DNA eluído (100 ng para o gene *bbp* e 200 ng para o gene *cna*). O restante do volume foi completado com água ultrapura (Ambion® DEPC). Para amplificação foram usadas as seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C; anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final do último ciclo, ocorreu a extensão final a 72°C por 10 minutos. Para controle das reações, foi utilizada a cepa padrão ATCC 25923 no controle positivo e água ultrapura (Ambion® DEPC) para controle negativo da reação. As amplificações do gene *cna* e *bbp* foram realizadas em reações independentes e os amplicons obtidos de ambas as reações foram inseridos em uma mesma lane para visualização no gel de agarose. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com Gel Red (Biotium®), DNA Ladder 100 pb (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (DNR- MoniBis Pro).

4.5 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DE PEQUENAS COLÔNIAS (SCVS)

Para avaliação da formação de SCVs, utilizou-se a metodologia descrita por ATALLA *et al.* (2008). Inicialmente, as cepas de *S. aureus* foram semeadas em ágar sangue e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, colônias foram transferidas para um tubo contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ até atingir crescimento correspondente à concentração 4 da escala McFarland ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL). Em seguida, uma suspensão bacteriana foi preparada em duas concentrações 5×10^6 UFC/mL e 5×10^7 UFC/mL e transferidas para outros tubos contendo 3mL caldo BHI suplementado com gentamicina (Sigma-Aldrich), na concentração de $1\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, realizou-se a incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, com agitação a 110 rpm, *overnight*. Após esse período, os tubos que não apresentaram turvação permaneceram incubados por um período de até 48 horas. Na figura 4 abaixo está representado o fluxograma com todas as etapas do experimento que possibilitou observar possíveis colônias SCVs.

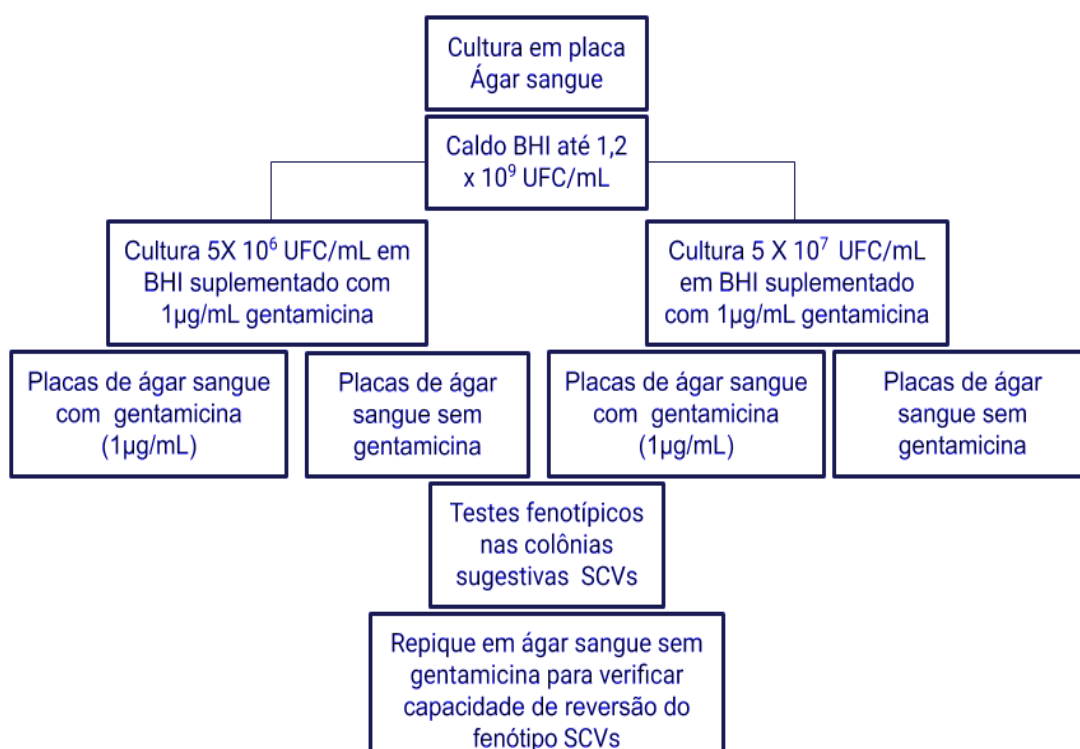


Figura 4. Fluxograma do experimento de pressão seletiva com gentamicina para identificação de cepas formadoras de SCVs.

As cepas que apresentaram turvação foram semeadas em placas contendo ágar sangue com e sem gentamicina (1µg/mL). Após incubação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em 24 e 48 horas, as culturas foram inspecionadas quanto a presença de colônias 2 ou 3 vezes menores que uma colônia normal de *S. aureus*, pigmentação e hemólise.

Todas as cepas de *S. aureus* com características de SCVs foram submetidas aos testes fenotípicos (coloração de Gram, catalase, coagulase, fermentação em ágar manitol salgado e suscetibilidade a CFO). As colônias suspeitas de SCVs foram repicadas para ágar sangue de carneiro sem gentamicina para verificar a estabilidade e analisar a capacidade de reversão do fenótipo para obtenção de colônias no tamanho normal na ausência do antibiótico gentamicina.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de Qui-quadrado ou exato de *Fisher* foram utilizados para analisar a associação entre as variáveis cepas de *S. aureus* isoladas de osteomielite e de portadores assintomáticos com a detecção dos genes das adesinas *cna* e *bbp* e o fenótipo SCV.

A análise estatística foi feita utilizando o *software* SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 20.0. Foi adotado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Todas as cepas de *S. aureus* (n=12) incluídas no estudo foram caracterizadas como cocos Gram-positivos com arranjo em cachos, catalase positivos, apresentando colônias com pigmento amarelado e hemólise em meio ágar sangue, como pode ser visto na figura 5 (A). Também apresentaram crescimento em ágar manitol salgado e

resultado positivo nos testes coagulase em lâmina e em tubo, identificado através da formação de coágulo no tubo apresentado na figura 5 (C).

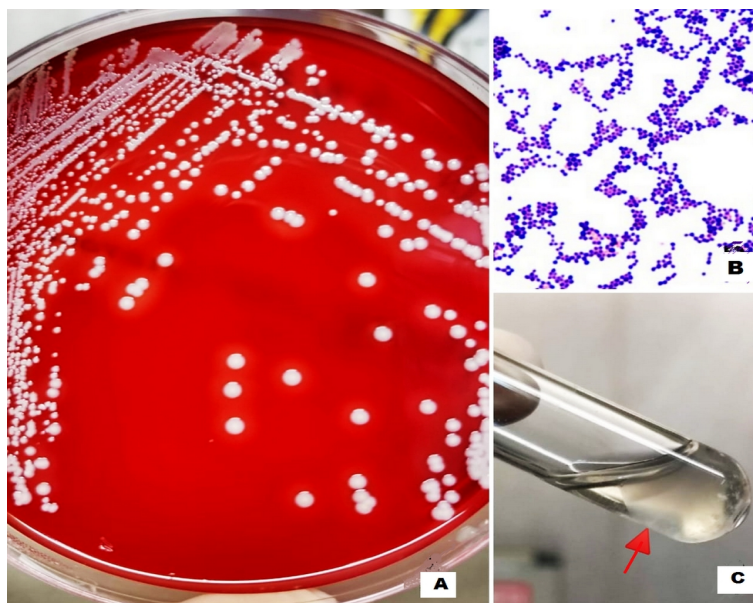


Figura 5: Testes fenotípicos em amostras de *Staphylococcus aureus*. (A) cultura em meio Ágar Sangue com presença de hemólise; (B) Imagem microscópica *S. aureus* com coloração de Gram; (C) Presença de coágulo no teste de coagulase em tubo.

Na análise molecular, todas as cepas apresentaram o gene *nuc*, confirmando pertencer à espécie *S. aureus*. Este e outros resultados dos testes fenotípicos realizados nas amostras clínicas e portadores nasais assintomáticos, estão na tabela 1, na página seguinte.

Tabela 1. Resultado dos testes fenotípicos e genotípicos de amostras clínicas de pacientes e portadores assintomáticos.

Amostras	PCR <i>GENE (nuc)</i>	Catalase	Coagulase Lâmina	Coagulase Tubo	AMS ¹	Perfil suscetibilidade CFO ² (Disco-difusão)	Medidas do halo inibitório de CFO (mm)
01	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	26
02	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	25
03	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	22
04	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	24
05	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	23
06	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	27
07	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	24
08	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	24
09	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	22
10	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	25
11	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	26
12	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	23
ATCC 25923	+	+	+	+	+	SENSÍVEL	27
ATCC 12228	-	+	-	-	-	RESISTENTE	10

¹ Ágar manitol salgado.² Cefoxitina.

S: sensível

R: resistente

No teste fenotípico para determinação do perfil de suscetibilidade aos β -lactâmicos (identificação de cepas MRSA), o resultado mostrou halos formados ao redor do disco do CFO medindo mais de 22 mm (figura 6), o que indica que as cepas mostraram ser sensíveis a esse antibiótico. Com isso, todas as cepas foram consideradas *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA, do inglês *Methicillin-susceptible S. aureus*).



Figura 6: Teste disco-difusão com cefoxitina, apresentando zona de inibição maior que 22 mm ao redor do disco.

Detectamos o gene da adesina de ligação ao Colágeno Tipo I (*cna*) em apenas uma cepa de *S. aureus* proveniente de portadores nasais, conforme mostrado na figura 7. O mesmo ocorreu com o gene da adesina de ligação à sialoproteína (*bbp*), onde apenas uma cepa de *S. aureus* (cepa 11), também proveniente de portadores nasais amplificou a região do gene *bbp* (Fig 7). Nas demais cepas de *S. aureus* provenientes de portadores nasais, bem como naquelas provenientes de pacientes com osteomielite maxilofacial, os genes *cna* ou *bbp* não foram detectados. Dessa forma, não observamos diferença significativa quando analisamos a detecção dos genes *cna* e *bbp* entre isolados de osteomielites e portadores assintomáticos, conforme descrito na tabela 2.

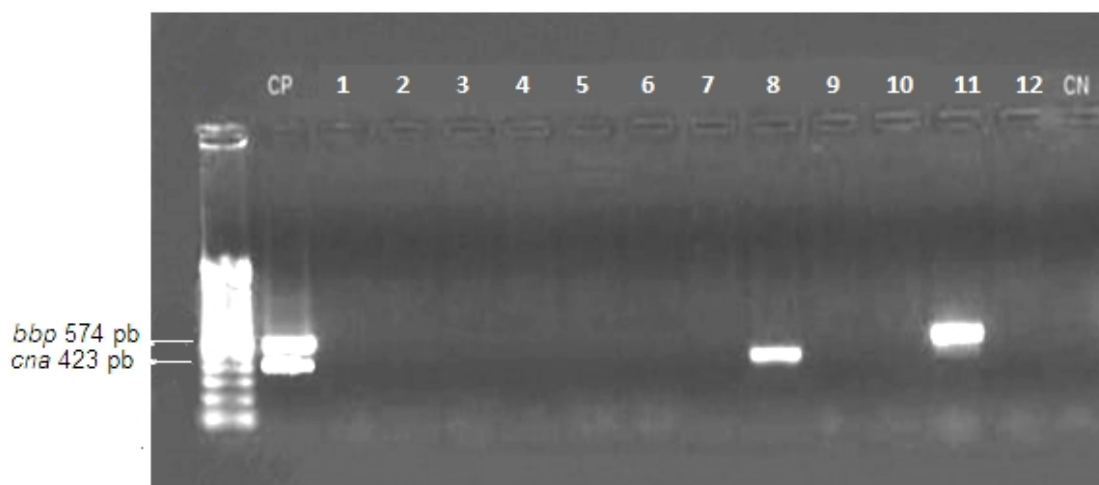


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes de virulência *cna* e *bbp*. Os amplicons correspondentes a cada amostra, obtidos em PCR independentes, foram inseridos na mesma lane para visualização, tanto nos controles quanto nas amostras (1 a 12). Marcador de peso molecular 100 pb; (CP) controle positivo ATCC 25923; (CN) controle negativo; 1, 2, 3, 4, 5 e 6, cepas provenientes osteomielite maxilofacial; 7, 8, 9, 10, 11 e 12, cepas de portadores nasais.

Quanto à capacidade de expressar o fenótipo de SCVs, das 06 cepas provenientes de pacientes com osteomielite maxilofacial, 5 (83,3%) apresentaram colônias com características fenotípicas comum às SCVs, com tamanho reduzido comparado ao tamanho normal da colônia parental (figura 8), coloração menos pigmentada e presença de hemólise, sendo esta última uma característica facultativa, podendo ou não estar presente. Todas as cepas que apresentaram colônias características de SCVs apresentaram resultados dos testes bioquímicos e morfotintoriais típicos de *S. aureus* e sensibilidade a CFO.

Na figura 8 apresentada a seguir é possível observar as características macroscópicas das colônias cultivadas no meio Ágar sangue com e sem gentamicina. Observa-se diferença na coloração do meio e colônias sem gentamicina é possível analisar com mais nitidez as características das colônias, principalmente as sugestivas de SCVs.

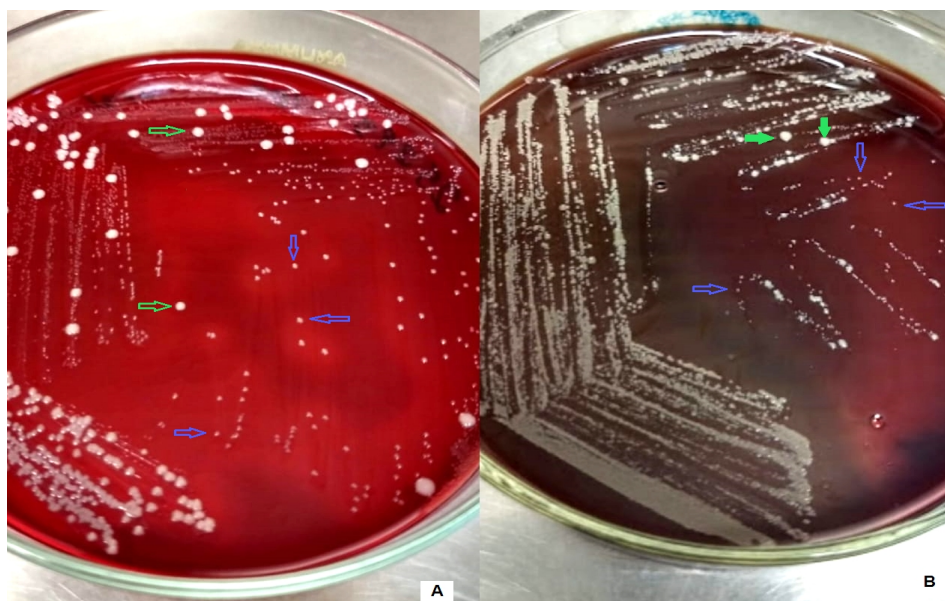


Figura 8. Cultura de *Staphylococcus aureus* exibindo fenótipo sugestivo de SCV (do inglês small colony variants). (A) cultura em meio ágar sangue sem gentamicina; (B) cultura em meio ágar sangue com 1µg/mL de gentamicina; Seta azul: supostas colônias SCVs; Seta verde: colônias parentais.

Nas cepas isoladas de portadores nasais não houve crescimento típico que pudesse ser caracterizado como SCV. Assim, observamos diferença significativa ($P = 0,008$) quando avaliamos a associação entre a expressão do fenótipo SCV e a origem dos isolados de infecção maxilofacial e de portadores assintomáticos (tabela 2).

Tabela 2. Associação entre a detecção dos genes das adesinas *cna* e *bbp* e expressão do fenótipo SCV em *S. aureus* isolados de osteomielite maxilofacial e de portadores assintomáticos.

VARIÁVEIS	Status	<i>S. aureus</i> isolados de osteomielite	<i>S. aureus</i> isolados de portadores nasais	Teste Exato de Fischer (p-valor)
Gene <i>cna</i>	Presente	0	1	0,5
	Ausente	6	5	
Gene <i>bbp</i>	Presente	0	1	0,5
	Ausente	6	5	
Fenótipo SCV	Presente	5	0	0,008*
	Ausente	1	6	

* $p \leq 0,05$

Para análise do fenótipo SCVs foi verificada qual melhor concentração inicial da cepa e melhores condições do meio de ágar sangue para identificar o aparecimento de possíveis SCV, após etapa prévia de incubação em caldo BHI com gentamicina e incubação com agitação a 37 °C, como mostra na tabela 3.

Tabela 3. Resultado do ensaio da análise de fenótipo SCV.

Cepas	Ágar sangue com gen 1µg/mL*		Ágar sangue sem gen		Capacidade de reversão SCVs
	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
S.a.22	+	+	-	-	+
S.a.30	+	+	+	-	+
S.a.32	-	-	+	-	+
S.a.33	+	+	+	-	+
S.a.36	-	-	-	+	-

* Gentamicina na concentração de 1µg/mL.

Utilizando as concentrações iniciais de 5 x 10⁶ UFC/mL e 5 x 10⁷ UFC/mL, observamos que ambas permitiram resultado semelhante quanto à capacidade de reversão do fenótipo SCV. Porém, observamos diferença quando analisamos o tempo de crescimento, onde a concentração 5 x 10⁶ UFC/mL em meio de ágar sangue sem gentamicina utilizou menos tempo para essa reversão, dentro de 24 horas de incubação, enquanto em meio ágar sangue com gentamicina, a reversão foi observada após este tempo.

Na figura 9 resumizamos a capacidade de reversão do fenótipo SCV das cepas de *S. aureus* subcultivadas em ágar sangue sem gentamicina, onde 4 das 5 cepas que apresentaram colônias características de SCVs conseguiram reversão para o fenótipo normal.

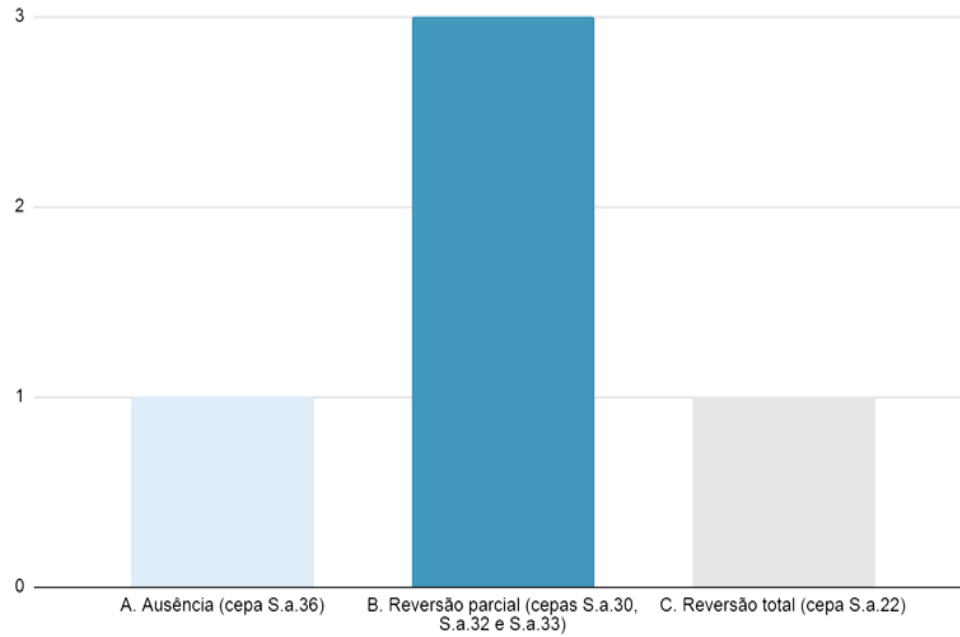


Figura 9. Capacidade de reversão do fenótipo SCV (do inglês small colony variants) isoladas de *S. aureus*: (A) permaneceu sem alteração de fenótipo; (B) ocorreu reversão de forma parcial, sendo observados dois tipos de colônias; (C) todas as colônias voltaram ao tamanho padrão.

Neste teste, foi observado que em uma das cepas apresentou reversão completa para colônias do tipo selvagem, outra cepa permaneceu com o fenótipo SCV sem alteração e outras 3 apresentaram reversão parcial, mantendo cultura mista.

6 DISCUSSÃO

A grande maioria das osteomielites são causadas por infecção bacteriana, ocasionando um processo inflamatório agudo ou crônico nos espaços medulares ou nas superfícies corticais do osso que se estende além do sítio inicial de envolvimento, resultando em destruição lítica e expansiva do osso envolvido com supuração e formação de sequestro ósseo, sendo apropriadamente denominada osteomielite supurativa. No entanto, existe um pequeno grupo de infecções ósseas inflamatórias idiopáticas, as quais não respondem a tratamentos antimicrobianos e demonstram esclerose óssea sem supuração ou formação de sequestro ósseo, sendo então denominadas de osteomielite esclerosante difusa (ZIMMERMANN *et al.*, 2020).

No complexo maxilofacial as osteomielites supurativas ocorrem com mais frequência, em comparação com os demais tipos de osteomielite, podendo apresentar evolução aguda ou crônica. A osteomielite supurativa aguda ocorre quando um processo inflamatório se dissemina através dos espaços medulares do osso e o tempo é insuficiente para permitir uma reação dos tecidos circunvizinhos à presença do infiltrado inflamatório. Se não tratada rapidamente, pode evoluir para osteomielite supurativa crônica (ZIMMERMANN *et al.*, 2020). Esta, por sua vez, ocorre quando a resposta inflamatória leva à produção de tecido de granulação, o qual subsequentemente é substituído por um tecido cicatricial denso, na tentativa de isolar a área infectada. Assim, a área de tecido necrótico circunscrita atua como um reservatório para as bactérias e os antimicrobianos têm grande dificuldade em alcançar esta região. Este padrão começa a evoluir cerca de um mês após a disseminação da infecção aguda inicial e resulta em um processo latente que é difícil de ser resolvido, a não ser que o tratamento seja mais agressivo. No entanto, vale ressaltar que as osteomielites crônicas podem surgir primariamente, mesmo que menos comumente, sem a ocorrência de um episódio agudo prévio (RIBEIRO *et al.*, 2009; ZIMMERMANN *et al.*, 2020).

As osteomielites supurativas crônicas que acometem o complexo maxilofacial são frequentes em países em desenvolvimento e estão relacionadas às dificuldades de acesso aos serviços de saúde, atingindo, na maioria das vezes, indivíduos com

menor poder aquisitivo que procuram os estabelecimentos públicos de saúde para tratamento. A maioria dos casos surgem após fraturas traumáticas dos maxilares, como as que ocorrem em acidentes de trânsito, na prática de esportes e nos ferimentos por arma de fogo (SILVA, 2014; MASOCATTO; OLIVEIRA e MENDONÇA, 2017). Doenças crônicas sistêmicas, estados de imunocomprometimento e doenças ou drogas associadas à diminuição da vascularização óssea são fatores predisponentes ao surgimento das osteomielites supurativas dos maxilares. Neste estudo, analisamos cepas de *S. aureus* isoladas de osteomielite supurativa crônica que evoluíram a partir de processos inflamatórios agudos e não apresentaram resposta a tratamentos iniciais de desbridamento cirúrgico associado à terapia antimicrobiana sistêmica. Estes isolados foram selecionados com a finalidade de analisar os mecanismos associados à persistência da infecção óssea, dando continuidade a estudos prévios realizados por nosso grupo (VON ZEIDLER, 1999).

S. aureus são considerados importantes agentes etiológicos de infecções ósseas e articulares (KAVANAGH *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado que a patogênese das infecções ósseas estafilocócicas pode estar relacionada à ligação específica de *S. aureus* a uma grande variedade de proteínas e componentes da matriz extracelular (JOSSE *et al.*, 2015). Mecanismos de internalização de *S. aureus* em osteoblastos viáveis também têm sido apontados como importantes processos relacionados ao escape do sistema imunológico, bem como um importante fator relacionado à baixa taxa de resposta ao tratamento antimicrobiano.

Outra característica que tem sido relacionada à patogenicidade de *S. aureus* é a capacidade de expressão do fenótipo SCV. Estas, se apresentam como colônias de tamanho reduzido e metabolismo mais lento, o qual tem sido descrito como um “mecanismo de latência” e vem sendo apontado como uma das estratégias para as bactérias sobreviverem de forma internalizada nos osteoblastos e persistirem, sendo menos sensíveis aos tratamentos com antimicrobianos (YANG *et al.*, 2018). Estudos apontam ainda que, o aparecimento do fenótipo SCV pode indicar a forma mais agressiva da infecção, podendo surgir sucessivas recidivas de infecção ou evoluir para o estágio crônico (KAVANAGH *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2020).

Desse modo, para verificar a importância dos fatores de virulência relacionados à presença de adesinas na patogênese da osteomielite supurativa crônica da região maxilofacial, nós realizamos um estudo comparativo entre o perfil de expressão de adesinas provenientes de isolados clínicos de *S. aureus* obtidos destes processos infecciosos e de espécimes provenientes de portadores assintomáticos. Para escolha das adesinas de ligação ao colágeno (*cna*) e sialoproteína (*bbp*), primeiramente nós consideramos resultados de estudo prévio realizado por nosso grupo, onde ensaios de adesão utilizando *S. aureus* radiomarcados foram usados para avaliar a capacidade de invasão bacteriana no ambiente intracelular de osteoblastos cultivados.

Os resultados deste estudo mostraram não haver diferença significativa entre as cepas isoladas de infecções maxilofaciais e de portadores assintomáticos. No entanto, após pré-tratamento com colágeno tipo I, cepas provenientes de infecções ósseas se aderiram significativamente mais do que cepas de portadores assintomáticos, demonstrando que o colágeno pode sim mediar a ligação específica de *S. aureus* aos osteoblastos, sugerindo, no entanto, que o mecanismo de adesão de *S. aureus* em osteoblastos não é exclusivamente mediado pelas adesinas de ligação ao colágeno. Assim, outros mecanismos de adesão podem estar sendo utilizados como polissacarídeos da cápsula e polipeptídeos da parede celular, conforme sugerido por Cunningham et al., 1996. Estes dados foram confirmados uma vez que 35,65% do total de bactérias aderidas permaneceram ligadas aos osteoblastos, mesmo após pré-tratamento com colágeno.

No presente estudo, nossos resultados não evidenciaram diferença significativa entre os isolados de infecções ósseas ou portadores nasais, quando avaliamos a presença do gene *cna* utilizando amplificação por PCR, tendo sido observada ausência do gene da adesina de ligação ao colágeno em todos isolados de infecções ósseas e sua presença em apenas uma amostra de portadores assintomáticos. Assim, estes resultados nos permitiram inferir que outros mecanismos devem ser determinantes para definir a colonização e iniciação do processo infeccioso ósseo.

Analisando a presença da sialoproteína (*bbp*) nestas amostras observamos resultado similar ao descrito anteriormente, onde apenas uma amostra de portador

assintomático apresentou amplificação deste gene por PCR, não sendo significativa a diferença entre isolados de infecções ósseas e portadores nasais. Apesar de alguns estudos apontarem o envolvimento das adesinas *cna* e *bbp* na patogênese das osteomielites (TRISTAN *et al.*, 2003), sua participação na patogênese da osteomielite supurativa crônica da região maxilofacial tem sido pouco relatada, o que pode estar relacionado ao reduzido número de casos desta condição.

No entanto, o percentual de detecção destas adesinas difere entre os estudos e sítios anatômicos. Em estudo realizado por CAMPOCCIA *et al.*, 2009, avaliou-se a presença dos genes *bbp* e *cna* como fatores de virulência em 27 cepas de *S. aureus* isolados de infecções em implantes ortopédicos, o gene *bbp* foi detectado em 93% dos casos e a presença concomitante dos genes *cna* e *bbp* foi definida como principal marcador de virulência em isolados de osteomielite associada a implantes ortopédicos. O autor ainda destaca que essas duas adesinas podem realizar um papel crucial na patogênese das infecções em implantes ortopédicos, uma vez que mostraram capazes de se ligar às proteínas ósseas mais abundantes e onde os biomateriais fazem interface com o tecido ósseo. Já no estudo de TRISTAN *et al.*, 2003, que analisou isolados clínicos através da técnica PCR multiplex para identificar adesinas de *S. aureus* provenientes, entre outros, de colonização nasal ($n = 82$) e osteomielite hematogênica e/ou artrite ($n = 37$), o resultado mostrou que 37% dos isolados de colonizadores nasais apresentavam o gene *cna*, comparado com 41% dos isolados de osteomielite hematogênica e/ou artrite. A detecção do gene *bbp*, por sua vez, foi de 21% e 38% respectivamente.

Portanto, nossos resultados divergem um pouco destes estudos, onde tivemos 16,6% de presença de *cna* e *bbp* em amostras de portadores nasais, comparadas a ausência de detecção em cepas de *S. aureus* isoladas de osteomielite crônica supurativa da região maxilofacial. Esse resultado sugere que mesmo com limitações em relação a número de cepas analisadas, a ausência dos genes *bbp* e *cna* podem sugerir que estas adesinas não sejam essenciais para a patogênese destas infecções, uma vez que tais cepas conseguiram causar a infecção sem presença dessas adesinas e, portanto, outros mecanismos devem estar relacionados ao desenvolvimento das osteomielites supurativas crônicas nesta região.

Avaliando outros mecanismos possivelmente relacionados à persistência da infecção óssea, realizamos um teste de triagem para identificação de cepas MRSA. Esta etapa é fundamental para conhecer o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e pode ser um dos fatores relacionados a não resposta ao tratamento observada dos casos incluídos no estudo, uma vez que cepas MRSA são resistentes a múltiplos antimicrobianos, não apenas aos β -lactâmicos, mas também a aminoglicosídeos, quinolonas e derivados macrolídeos (TUCHSCHERR *et al.*, 2016; VESTERGAARD *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2020).

Em nossa avaliação, todas as cepas selecionadas foram classificadas como MSSA. Tal fato pode ser justificado pelo reduzido número de amostras analisadas e também pela origem dos patógenos, uma vez que as osteomielites supurativas crônicas incluídas neste estudo foram provenientes de infecção de natureza traumática, onde não há frequência significativa de cepas MRSA, as quais são mais frequentes em infecções nosocomiais (CATÃO RMR *et al.*, 2013).

A frequência de infecção por MSSA ou MRSA em osteomielite supurativa crônica não é bem esclarecida na literatura, possivelmente devido à falta de evidências clínicas, uma vez que infecções neste sítio são pouco comuns, e também pelo fato de não existirem protocolos padrão para uniformizar o tratamento das osteomielites supurativas crônicas na região maxilofacial. Dessa forma, estudos têm destacado a necessidade de ampliação de pesquisas em infecções desta natureza, causadas tanto por MSSA quanto por MRSA, uma vez que ambos têm capacidade de virulência e patogenicidade e podem ser agentes etiológicos das osteomielites supurativas crônicas (SANTOS *et al.*, 2007; BRIDE *et al.*, 2019).

Resultados do nosso estudo mostraram que a capacidade de alteração do fenótipo selvagem para o fenótipo variante de pequenas colônias (SCVs) ocorreu em 5 das 6 amostras de *S. aureus* isoladas de osteomielites supurativas crônicas, enquanto este mesmo processo não foi observado nas cepas isoladas de portadores nasais, mostrando ter papel relevante na patogênese destas infecções ($P = 0,008$). Nossos resultados corroboram com os resultados descritos por Loss *et al.*, 2019, que apontaram o fenótipo SCV como uma característica específica do processo infeccioso provocado por *S. aureus*, sobretudo nas infecções crônicas persistentes.

Assim, para persistir e se proteger em um ambiente inóspito, subpopulações de *S. aureus* de crescimento lento e metabolismo latente adquirem características fenotípicas e patogênicas distintas, como formação de colônias menores em placas de ágar, atividade hemolítica e produção de coagulase reduzidas (LOSS *et al.*, 2019). Estudos indicam que fatores que causam estresse ambiental externo, como o induzido pela presença de antimicrobianos, podem desencadear o surgimento de SCVs (TUCHSCHERR *et al.*, 2016).

Teste *in vitro* de pressão seletiva utilizando gentamicina nos possibilitou observar o comportamento de *S. aureus* isolados de osteomielite supurativa crônica maxilofacial onde, mediante ao estresse induzido pelo acréscimo do antimicrobiano na cultura, observamos alterações fenotípicas compatíveis com SCVs, sugerindo que esse mesmo processo possa ocorrer durante o tratamento antimicrobiano em pacientes. Nossos resultados mostraram que a maioria das cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes com infecção óssea (5/6) apresentaram colônias com características sugestivo de SCVs, indicando que este fenótipo tem papel relevante na patogênese destas infecções.

Resultados similares foram descritos em outros estudos onde, em processos infecciosos submetidos à condição de estresse, *S. aureus* alterou seu fenótipo, quando comparado às colônias parentais, exibindo o fenótipo SCV. Isto proporciona a estas subpopulações uma maior resistência à ação dos antimicrobianos e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, favorecendo assim sua persistência no tecido ósseo e evolução para o estágio crônico da osteomielite (VALOR F *et al.*, 2015; OU JJ *et al.*, 2016; LOSS *et al.*, 2019).

Estudos mostraram ainda que, além do estresse provocado por antimicrobianos, há outras formas de provocar estresse em *S. aureus* e com isso induzir a formação de SCVs, como por exemplo, redução de pH, uso de peptídeos catiônicos e nutrição limitada (TUCHSCHERR *et al.*, 2016), sendo este último denominado teste de auxotrofia, característica auxotrófica dependente de fatores de crescimento, como menadiona, hemina ou timidina (SOUZA, D. C. *et al.*, 2016; LOSS *et al.*, 2019).

No entanto, nosso estudo tem algumas limitações, como o reduzido tamanho amostral e falta de um método de diagnóstico de SCV mais preciso, que nos dificultou compreender melhor o funcionamento das SCVs e sua capacidade de

reversão do deste fenótipo para a forma selvagem da colônia (LEE et al., 2020). Neste contexto, nossos resultados mostraram que das 5 amostras subcultivadas sem estresse provocado pelo antibiótico, 4 (80% das amostras) apresentaram colônias que fizeram a reversão para a forma selvagem ou parental. Essa tendência de reversão dos SCVs e a dificuldade em se obter cultura a partir delas, tornam a pesquisa com SCVs de *S. aureus* um grande desafio (TUCHSCHERR et al., 2010). Com isso, é cada vez mais urgente a necessidade de mais estudos que possam compreender os mecanismos de formação de SCVs e avançar no diagnóstico e desenvolvimento de protocolos de tratamento das osteomielites supurativas crônicas induzidas por *S. aureus* (LEE et al., 2020).

Outro mecanismo importante de virulência envolvido na patogênese das osteomielites crônicas e favorecido nas SCVs é a internalização em osteoblastos, uma vez que este processo auxilia nos mecanismos de escape do sistema imunológico e reduz o acesso de antimicrobianos em níveis terapêuticos adequados. Desse modo, uma vez que o tecido ósseo não facilita a penetração de altas concentrações de drogas, uma característica que impõe uma restrição ao tratamento de infecções ósseas, a viabilidade de *S. aureus* dentro dos osteoblastos pode ser vista como um fator determinante na resposta ao tratamento e na persistência e recorrência de infecções após tratamentos prolongados. Isto pode levar a repetidas intervenções cirúrgicas para remover o tecido danificado, aumentando o custo e o comprimento do tratamento.

Desse modo, considerando que as osteomielites supurativas crônicas são processos de origem multifatorial que dependem das características de ambos patógeno e hospedeiro, em doenças causadas por *S. aureus*, fatores de virulência específicos das cepas, com destaque para as SCVs, são cruciais para a patogênese da infecção. Assim, nossos resultados mostraram que *S. aureus* isolados de pacientes com infecção óssea maxilofacial são mais virulentos do que as cepas isoladas de portadores nasais.

Como perspectiva futura, avaliamos a necessidade de identificação do fenótipo SCV de *S. aureus* e do desenvolvimento de novos métodos utilizando ferramentas de biotecnologia que facilitem essa identificação na rotina laboratorial, possibilitando diagnóstico em menor tempo e de forma mais precisa.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que genes de virulência associados à expressão de adesinas *bbp* e *cna* não foram determinantes para o estabelecimento de infecções ósseas considerando as cepas analisadas de *Staphylococcus aureus* isoladas de osteomielite maxilofacial e de portadores nasais assintomáticos, sugerindo que outros mecanismos estejam envolvidos neste processo, como a manifestação do fenótipo SCV, o qual mostrou ter papel importante no estabelecimento e persistência das osteomielites supurativas crônicas.

REFERÊNCIAS

- ATALLA, H. *et al.* Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. **Foodborne pathogens and disease**, v. 5, n. 6, p. 785-799, 2008. ISSN 1535-3141.
- ATSHAN, S. S. *et al.* Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012. ISSN 1110-7243.
- BENTO, D. A. Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental. 2003. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BRIDE, Lais de Lima *et al.* Diferenças nos perfis de resistência e genes de virulência entre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e suscetível à meticilina de diferentes linhagens em um hospital público terciário. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 52, e20190095, 2019.
- CATÃO RMR *et al.* Prevalência De Infecções Hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos. **Rev enferm UFPE online**, Recife, 7(8):5257-64, ago., 2013.
- CLARO, T. *et al.* *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. **PloS one**, v. 6, n. 4, 2011.
- CAMPOCCIA D, *et al.* The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. **Biomaterials**. 2009 Dec;30(34):6621-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.032. Epub 2009 Sep 15. PMID: 19758694.
- DELGADO-VALVERDE, M. *et al.* Variantes pequeñas de *Staphylococcus aureus*: utilidad de distintas pruebas para su diagnóstico y estudio de sensibilidad. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 2, p. 96-98, 2014. ISSN 0213-005X.
- Ferreira PV, Cavalcanti AS, Silva GA. Linear growth and bone metabolism in Pediatric patients with inflammatory bowel disease. **J Pediatr (Rio J)**. 2019; 95:S59-S65.
- FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014. ISSN 1740-1534.
- GUO *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2020.10.10.3389/fcimb.2020.00107.

HOFSTEE *et al.* Current Concepts of Osteomyelitis: From Pathologic Mechanisms to Advanced Research Methods. **The American Journal of Pathology**. Volume 190, Issue 6, 2020, Pages 1151-1163, ISSN 0002-9440, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.02.007>.

JOSSE, J.; VELARD, F.; GANGLOFF, S. C. Staphylococcus aureus vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 85, 2015. ISSN 2235-2988.

KAVANAGH, N. *et al.* Staphylococcal osteomyelitis: disease progression, treatment challenges, and future directions. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 2, p. e00084-17, 2018. ISSN 0893-8512.

KUDVA A., *et al.* Chronic recurrent osteomyelitis: A surgeon's enigma. **ORIGINAL ARTICLE**, 2018.

LEE J, Zilm P.S. and Kidd S.P. Novel Research Models for Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCV) Development: Co-pathogenesis and Growth Rate. **Front. Microbiol.** 11:321.2020 doi: 10.3389/fmicb.2020.00321

LEW, D. P.; WALDVOGEL, F. A. Osteomyelitis. **The Lancet**, v. 364, n. 9431, p. 369-379, 2004. ISSN 0140-6736.

LOSS, Guilherme *et al.* Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 9:363.doi: 10.3389/fcimb.2019.00363, 2019.

MADANI, A.; GARAKANI, K.; MOFRAD, M. R. Molecular mechanics of Staphylococcus aureus adhesin, *cna*, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. **PloS one**, v. 12, n. 6, 2017.

MACHADO e LINGORDO. Análise da expressão imunoistoquímica e de proteínas associadas a reabsorção óssea em tecido gengival humano de pacientes tabagistas e diabéticos portadores de doença periodontal. Barbara do Vale Machado; Fany Souza Lingordo. Trabalho de conclusão de curso (odontologia). Universidade Federal Fluminense, Nova Friburgo, 2015.

MASOCATTO, D. C.; OLIVEIRA, M. M.; MENDONÇA, J. C. G. Osteomielite crônica Mandibular: relato de caso. **Arch Health Invest**, v. 6, n. 2, p. 48-52, 2017.

MOTALLEBI, M. *et al.* Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains with staphylococcal cassette chromosome mec type IIIA isolated from burn patients. **Microbial pathogenesis**, v. 97, p. 34-37, 2016. ISSN 0882-4010.

MOURA, G. *et al.* Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 9, p. 7804-7807, 2018. ISSN 0022-0302.

RIBEIRO *et al.* Tratamento da osteomielite supurativa crônica de mandíbula em criança com curto período de hospitalização. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac** v.9, n.2, p. 9 - 16, 2009.

SANTOS, a. I., et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab.** v. 43, n. 6, p. 413-423. 2007.

SCHLUND et al. Mandibular Osteomyelitis Following Implant Placement. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.** Volume 75, Issue 12, 2017, Pages 2560.e1-2560.e7, ISSN 0278-2391, <https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.07.169>.

SILVA, ANTONIO LENILSON GOMES DA. OSTEOMIELEITE DOS MAXILARES: Uma revisão de literatura. Aspectos clínicos, radiográficos, terapêuticos e microbiológicos. **Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião Dentista**, pelo curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba UEPB- Campus I-Campina Grande. PB. 2014.

STROBEL, M. et al. Post-invasion events after infection with Staphylococcus aureus are strongly dependent on both the host cell type and the infecting S. aureus strain. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 9, p. 799-809, 2016. ISSN 1198-743X.

SUNDEEP KHOSLA, MINIREVIEW: Sistema OPG / RANKL / RANK, **Endocrinologia.** Volume 142, edição 12, p 5050–5055. 2001, <https://doi.org/10.1210/endo.142.12.8536>

SUN HAI-JIANG, Xue L, Wu CB, Zhou Q. Clinical Characteristics and Treatment of Osteopetrosis Complicated by Osteomyelitis of the Mandible. **J Craniofac Surg.** 2016 Nov;27(8):e728-e730. doi: 10.1097/SCS.0000000000003048. PMID: 28005799.

TIEMANN A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S: Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. **GMS Interdisciplinary Plastic and Reconstructive Surgery DGPW** 2014, Vol. 3, ISSN 2193-8091

TRISTAN A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. **J Clin Microbiol.** 2003 Sep;41(9):4465-7. doi: 10.1128/jcm.41.9.4465-4467.2003. PMID: 12958296; PMCID: PMC193818.

TUCHSCHERR, L. et al. Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. **J Infect Dis.** 2010 Oct 1;202(7):1031-40. doi: 10.1086/656047. PMID: 20715929.

TUCHSCHERR, L. et al. Staphylococcus aureus develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 438-448, 2016. ISSN 1460-2091.

VALOUR, F. et al. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 6, p. 568. e1-568. e11, 2015. ISSN 1198-743X.

VELÁZQUEZ-MESA ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Mex.* 2005;47(5):381-7. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1389012&orden=58796&info=link>

VERMELHO, A. B. et al. **Práticas de Microbiologia**. 1°. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. 227 p.

VESTERGAARD M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. **Microbiol Spectr.** 2019 ; 7(2)doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018. PMID: 30900543.

VON ZEIDLER, Sandra Lúcia Ventorin. Análise comparativa de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com infecção óssea maxilofacial e de portadores orais utilizando cultura de osteoblastos. Dissertação (Mestrado em ciências (microbiologia) - Universidade de São Paulo, 1999.

ZIMMERMANN C, Stuepp RT, Rath IBDS, Grando LJ, Daniel FI, Meurer MI. Diagnostic Challenge and Clinical Management of Juvenile Mandibular Chronic Osteomyelitis. **Head Neck Pathol.** 2020; 14(3):842-846. doi:10.1007/s12105-019-01087-1

YANG, D. et al. Novel insights into *Staphylococcus aureus* deep bone infections: the involvement of osteocytes. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e 00415-18, 2018. ISSN 2150-7511.