

Isabela Leite de Oliveira Rosa

**PREVALÊNCIA DE *Clostridioides difficile* NO
BIOFILME DENTAL E SUA RELAÇÃO COM
DOENÇA PERIODONTAL**



**Monografia apresentada ao Instituto
de Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como pré-requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO RIO DE JANEIRO
JULHO / 2025**

**Trabalho realizado no Laboratório de
Microbiologia Oral, do Departamento de
Microbiologia Médica do Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ, sob a
orientação do(a) Professor(a) Ana Paula
Vieira Colombo e co-orientação
Professor(a) Eliane de Oliveira.**

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

R694p ROSA, ISABELA
 Prevalência de Clostridioides difficile no
 biofilme dental / ISABELA ROSA. -- Rio de Janeiro,
 2025.
 48 f.

Orientadora: Ana Paula Vieira Colombo .
Coorientadora: Eliane de Oliveira Ferreira .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2025.

1. Clostridioides difficile . 2. Biofilme dental
. 3. Oral-fecal. 4. Microbiota . 5. PCR. I. Vieira
Colombo , Ana Paula , orient. II. de Oliveira
Ferreira , Eliane , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): **Isabela Leite de Oliveira Rosa** DRE:**121065927**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Karla Rodrigues Miranda (Presidente)
Dr. Kelly Cristiny Borges Rainha
Dr. Adriana Miranda de Oliveira
Prof. Leandro Araujo Lobo (Suplente)

Título da Monografia: “*Prevalência de Clostridioides difficile no biofilme dental e sua relação com doença periodontal*”

Local: sala D-27, CCS/UFRJ

Data e hora de início: **08 de julho de 2025 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 08 de JULHO..... de 2025.

NOTA: Banca Examinadora:

9,0

Karla Rosa Mira

Prof. Karla Rodrigues Miranda (Presidente)

9,0

Kelly Cristiny Borges Rainha

Dr. Kelly Cristiny Borges Rainha

9,0

Adriana Miranda de Oliveira

Dr. Adriana Miranda de Oliveira

Prof. Leandro Araujo Lobo (Suplente)

Aluno(a):

Orientador(a)
(e coorientador):

Coordenadora de
TCC:

Isabela Leite de Oliveira Rosa

Isabela Leite de Oliveira Rosa

Ana-Paula Vieira Colombo e Eliane de Oliveira Ferreira

Marinella Silva Laport

Profa. Marinella Silva Laport

DEDICATÓRIA

Aos meus avós,

Sonia Leite da Silva (*in memorian*), Dionísio Leite da Silva (*in memorian*),

Maria de Moura Rosa (*in memorian*), Hélio de Oliveira Rosa(*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Nenhuma conquista é alcançada sozinha. Este trabalho representa o resultado de um esforço coletivo, construído com base em apoio, colaboração e confiança, que fizeram toda a diferença ao longo dessa trajetória.

Primeiramente, agradeço profundamente à minha orientadora, Ana Paula Vieira Colombo, a quem tive o grande prazer de chamar de orientadora por três anos. Sou imensamente grata pela confiança que depositou em mim durante todo o projeto. Essa confiança não apenas me impulsionou a seguir em frente, mas também me ajudou a crescer como pessoa, tornando-me mais confiante e determinada a seguir o caminho da ciência. Ana Paula se tornou uma inspiração para mim, tanto como mulher quanto como cientista. Agradeço demais por todas as broncas, risadas e, principalmente, por todos os ensinamentos. À minha co-orientadora, Eliane de Oliveira Ferreira, agradeço por sua ajuda e por me ensinar tantas coisas ao longo deste processo. Seu vasto conhecimento sobre *Clostridiooides difficile* foi essencial para o sucesso deste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório, sou grata por todo o apoio, pelos bons momentos compartilhados e pelos ensinamentos trocados. Cada um de vocês, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse projeto fosse possível, e sou muito grata por isso.

Aos meus pais, Adauto de Oliveira Rosa e Cátia Regina Leite da Silva, minha mais profunda gratidão por todo o apoio e dedicação desde o início da minha vida escolar até o fim da minha graduação. Vocês sempre acreditaram em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma duvidava. Foi com o amor, incentivo e esforço de vocês que pude chegar até aqui. Cada conquista desta caminhada também é de vocês.

Ao meu irmão, Gabriel Leite de Oliveira Rosa, por todo apoio e amor. Sempre me espelhei em você, que sempre acreditou que eu conseguiria entrar na Universidade Federal do Rio de Janeiro, e me ajudou emocionalmente em cada etapa da minha graduação. Sou grata por ter você como meu irmão.

Ao meu padrinho, Rogério de Souza Pedro, que foi uma figura essencial na minha trajetória. Mesmo morando em outro país, ele nunca mediu esforços para me ajudar, investindo na minha educação ao longo de todos esses anos. Com dedicação, esteve presente em cada etapa, contribuindo para que eu pudesse trilhar esse caminho até o fim. Sem seu apoio, essa formação também não teria sido possível.

Aos meus amigos, que sempre acreditaram em mim e celebraram cada uma das minhas conquistas, deixo meu sincero agradecimento. Em especial à minha melhor

amiga, Alicia Rodrigues Coutinho de Souza, que tem sido uma presença constante desde o ensino fundamental. Ao longo dos anos, ela esteve ao meu lado nos momentos mais desafiadores, contribuindo não apenas em atividades escolares, mas, sobretudo, oferecendo apoio emocional. Sua sensibilidade em me ajudar com o estresse e a ansiedade foi de extrema importância para que eu conseguisse seguir em frente com mais confiança.

Aos meus amigos de curso, Karen Maria, Johnatha de Souza Santos, Júlia Morgado, Lucas José Soares Santiago e Maria Eduarda Campos Castro dos Reis e Bruna de Araujo Miranda, agradeço por terem feito parte dessa jornada tão bonita comigo. Sem vocês, o caminho teria sido muito mais difícil e não teria sido tão feliz. Hoje, sou muito grata por ter cada um de vocês na minha vida.

Por fim, agradeço à PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), pelo incentivo financeiro ao longo desses três anos, que foi essencial para a realização deste trabalho.

RESUMO

ISABELA LEITE DE OLIVEIRA ROSA

**PREVALÊNCIA DE *Clostridioides difficile* NO BIOFILME DENTAL
E SUA ASSOCIAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL**

Orientador: Ana Paula Vieira Colombo

Coorientador: Eliane de Oliveira Ferreira

Clostridioides difficile é um bacilo Gram-positivo anaeróbio que coloniza o intestino grosso de 4 a 15% dos indivíduos saudáveis, podendo causar quadros graves de diarreia e colite em situações de disbiose intestinal, especialmente após o uso prolongado de antibióticos e em ambientes hospitalares. Através da ingestão de alimentos contaminados com seus esporos, *C. difficile* chega ao intestino onde encontra condições favoráveis para germinação e colonização. Seus principais fatores de virulência são exotoxinas, responsáveis pela manifestação clínica da doença. A microbiota oral, juntamente com a gastrointestinal, compõem o microbioma do aparelho digestivo. O biofilme dental associado às doenças periodontais (DPs) é altamente diversificado e apresenta um estado de disbiose, caracterizado por desequilíbrio na composição microbiana e favorecimento de microrganismos patogênicos. Esse ambiente disbiótico possui características como baixa tensão de oxigênio (condições anaeróbicas), acúmulo de nutrientes decorrente da inflamação tecidual, redução de espécies comensais e aumento da produção de matriz extracelular, criando um nicho favorável à colonização por bactérias anaeróbias e oportunistas. A literatura já descreve a coagregação entre *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridioides difficile*, e essas interações, aliadas às condições anaeróbicas do biofilme disbiótico, sugerem que o biofilme periodontal pode atuar como um reservatório oral para *C. difficile*, contribuindo para sua persistência e possível disseminação. Logo, o presente estudo investigou a presença de *C. difficile* na microbiota oral e fezes de pacientes com saúde e DPs. A hipótese é de que pacientes com periodontite possuem uma prevalência maior desse patógeno na microbiota oral do que indivíduos saudáveis. A detecção de *C. difficile* e suas toxinas em amostras de saliva, biofilme subgengival e fezes foram confirmadas por PCR-multiplex, utilizando iniciadores para os genes da triosefósфato isomerase (*tpi*), toxina A (*tcdA*) e toxina B (*tcdB*). A distribuição desses genes nos diferentes grupos clínicos foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. Foram incluídos 659 pacientes neste estudo, embora nem todos tenham fornecido as três amostras biológicas. A prevalência geral do gene *tpi* de *C. difficile* foi de 29,1%. Desses, 49% apresentavam também algum gene de toxina, sendo *tcdB* o mais frequentemente detectado (46,8%), especialmente nas amostras orais (23,6% na saliva; 60% no biofilme). Pacientes com periodontite apresentaram maior prevalência do gene *tpi* do que aqueles com gengivite ou saúde periodontal ($p = 0.001$), em particular pacientes com estágios avançados da doença ($p < 0.05$). Não foram detectados genes para toxinas A/B em amostras de fezes ou biofilme de pacientes saudáveis, enquanto >70 % das amostras de biofilme de pacientes com DPs foram positivas ($p < 0.001$). A detecção molecular de *C. difficile* em amostras orais e fecal teve correlação com índices de inflamação periodontal ($p < 0.05$). Houve correlação intra-individual significativa entre a presença do gene *tpi* in fezes e saliva de pacientes com periodontite ($Kappa = 0.314$; $p = 0.003$). A alta frequência dos genes *tpi* and *tcdB* específicos para *C. difficile* no biofilme subgengival disbiótico associado à periodontite avançada sugere que esse patógeno possa colonizar esse nicho oral.

Palavras-chaves: *Clostridioides difficile*; Doenças periodontais; Biofilme dental; Microbiota oro-fecal; toxinas; PCR.

ABSTRACT

ISABELA LEITE DE OLIVEIRA ROSA

**PREVALENCE OF *Clostridioides difficile* IN DENTAL BIOFILM
AND ITS ASSOCIATION WITH PERIODONTAL DISEASE**

Orientador: Ana Paula Vieira Colombo

Coorientador: Eliane de Oliveira Ferreira

Clostridioides difficile is an anaerobic Gram-positive bacillus that colonizes the large intestine of 4 to 15% of healthy individuals and can cause severe diarrhea and colitis in cases of intestinal dysbiosis, especially after prolonged use of antibiotics and in hospital settings. Through the ingestion of food contaminated with its spores, *C. difficile* reaches the intestine where it finds favorable conditions for germination and colonization. Its main virulence factors are exotoxins, which are responsible for the clinical manifestation of the disease. The oral microbiota, together with the gastrointestinal microbiota, make up the microbiome of the digestive tract. The dental biofilm associated with periodontal diseases (PDs) is highly diverse and presents a dysbiotic state, characterized by an imbalance in microbial composition and the predominance of pathogenic microorganisms. This dysbiotic environment exhibits features such as low oxygen tension (anaerobic conditions), accumulation of nutrients resulting from tissue inflammation, reduction of commensal species, and increased extracellular matrix production, creating a niche favorable for the colonization of anaerobic and opportunistic bacteria. The literature has already described the coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridioides difficile*, and these interactions, together with the anaerobic conditions of the dysbiotic biofilm, suggest that the periodontal biofilm may serve as an oral reservoir for *C. difficile*, contributing to its persistence and potential dissemination. Therefore, the present study investigated the presence of *C. difficile* in the oral microbiota and feces of healthy patients with PDs. The hypothesis is that patients with periodontitis have a higher prevalence of this pathogen in the oral microbiota than healthy individuals. The detection of *C. difficile* and its toxins in saliva, subgingival biofilm, and feces samples was confirmed by multiplex PCR using primers for the triosephosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), and toxin B (*tcdB*) genes. The distribution of these genes in the different clinical groups was assessed by the chi-square test. 659 patients were included in this study, although not all provided the three biological samples. The overall prevalence of the *C. difficile tpi* gene was 29.1%. Of these, 49% also had some toxin gene, with *tcdB* being the most frequently detected (46.8%), especially in oral samples (23.6% in saliva; 60% in biofilm). Patients with periodontitis had a higher prevalence of the *tpi* gene than those with gingivitis or periodontal health ($p = 0.001$), particularly patients with advanced stages of the disease ($p < 0.05$). No genes for toxins A/B were detected in stool or biofilm samples from healthy patients, whereas >70% of biofilm samples from patients with PDs were positive ($p < 0.001$). Molecular detection of *C. difficile* in oral and fecal samples correlated with indices of periodontal inflammation ($p < 0.05$). There was a significant intra-individual correlation between the presence of the *tpi* gene in stool and saliva of patients with periodontitis ($Kappa = 0.314$; $p = 0.003$). The high frequency of the *tpi* and *tcdB* genes specific for *C. difficile* in the dysbiotic subgingival biofilm associated with advanced periodontitis suggests that this pathogen may colonize this oral niche.

Keywords: *Clostridioides difficile*; periodontal diseases; dental biofilm; oro-fecal microbiota; toxins; PCR

RESUMO PARA LEIGOS

ISABELA LEITE DE OLIVEIRA ROSA

A PRESENÇA DA BACTÉRIA *Clostridioides difficile* EM PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL

Orientador: Ana Paula Vieira Colombo

Coorientador: Eliane de Oliveira Ferreira

A bactéria *Clostridioides difficile* é conhecida por causar infecções intestinais grave, sobretudo em indivíduos que utilizaram antibióticos recentemente ou apresentam imunidade comprometida. Ela pode causar desde diarreias intensas até complicações mais sérias, e é uma das principais causas de infecções adquiridas em hospitais. Essa bactéria pode viver no nosso intestino sem causar problemas, mas quando o equilíbrio das "bactérias boas" é afetado, como após o uso de antibióticos, *C. difficile* pode se multiplicar e liberar toxinas que danificam o intestino. Além disso, ela consegue se proteger formando uma espécie de 'casca' muito resistente, chamada esporo, que permite que ela sobreviva por muito tempo no ambiente, mesmo em situações difíceis. A transmissão dessa bactéria ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com os esporos, pela via fecal-oral. A cavidade oral é um ambiente complexo que abriga milhões de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus, que coexistem em equilíbrio na chamada microbiota oral. Quando há um desequilíbrio da placa dental, como ocorre nas doenças gengivais, pode-se criar um ambiente mais favorável ao crescimento de microrganismos que fazem mal à saúde. Neste estudo, investigamos a bactéria *C. difficile* na saliva, placa dental e nas fezes de pessoas com diferentes níveis de saúde bucal. Para isso, utilizamos uma técnica moderna chamada PCR multiplex, que identifica genes específicos dessa bactéria nas amostras orais e fecais. Nosso objetivo é entender se existe uma relação entre doenças gengivais (como a periodontite e gengivite), e a presença dessa bactéria. Amostras de mais de 600 pacientes foram avaliadas e detectamos *C. difficile* em 29,1%. Entre as amostras positivas, 49% apresentavam também algum gene de toxina, sendo *tcdB* o mais detectado (46,8%), especialmente na saliva (23,6%) e na placa dental (60%). O gene de *C. difficile* foi mais detectado em pacientes com periodontite em estágios avançados do que aqueles com gengivite ou saúde periodontal. Mais de 70 % da placa dental de pacientes com doenças periodontais tinham genes para as toxinas. A presença de *C. difficile* na boca e nas fezes estava associada com mais inflamação gengival. Pacientes com periodontite que tinham essa bactéria na saliva tinham mais probabilidade de também terem nas fezes. Os resultados sugerem que a placa dental de pacientes com doença gengival avançada pode abrigar essa bactéria intestinal.

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Pelo presente instrumento, Isabela Leite de Oliveira Rosa, portador(a) da Cédula de Identidade nº 297833378, CPF nº 19483105706 e seu orientador, Ana Paula Vieira Colombo, na condição legal de autores/detentores dos direitos autorais sobre o resumo de divulgação científica (**Resumo para pessoas leigas**) contido na monografia (Trabalho de Conclusão do Curso) de graduação em Ciências Biológicas; Microbiologia e Imunologia da UFRJ, intitulada *Prevalência de Clostridioides difficile no biofilme dental e sua relação com doença periodontal*, decidem pelo presente Termo de Cessão de Direitos Autorais, autorizar a divulgação e ceder total e gratuitamente ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sediado na Av. Carlos Chagas Filho 373, CCS – bloco I, CEP 21941-902, CNPJ nº 33.663.683/0001-16, os direitos patrimoniais e de autor referentes à criação supramencionada, em caráter permanente, irrevogável e NÃO EXCLUSIVO, todos os direitos patrimoniais NÃO COMERCIAIS de utilização do **Resumo para Pessoas Leigas**, em qualquer idioma e em todos os países, restando claro que serão devidos os respectivos créditos autorais em todas as utilizações da obra e que esta terá sua integridade original mantida. A divulgação poderá ser realizada em diferentes plataformas (website, Facebook, Instagram, Youtube) associadas ao IMPG e à Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia da UFRJ.

Rio de Janeiro, .26.... de ..06..... de 20.25....

Documento assinado digitalmente:
 ISABELA LEITE DE OLIVEIRA ROSA
Data: 26/06/2025 09:37:39-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

(Nome do aluno)

Documento assinado digitalmente
 ANA PAULA VIEIRA COLOMBO
Data: 26/06/2025 15:50:42-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

(Nome do orientador)

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA LEIGOS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Clostridioides difficile</i>	1
1.2 Epidemiologia das infecções causadas por <i>Clostridioides difficile</i> (CDI)	3
1.3 O microbioma do trato gastrointestinal (TGI)	5
1.4 A microbiota oral.....	6
1.5 A microbiota periodontal e sua relação com doenças inflamatórias do TGI	8
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
4. ARTIGO PUBLICADO.....	15
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO.....	30
7 REFERÊNCIAS	31
ANEXO.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Clostridioides difficile*

A bactéria *C. difficile*, anteriormente conhecida como *Clostridium difficile*, é um bacilo Gram-positivo anaeróbio, com dimensões entre 3-5 µm de comprimento, que possui uma parede celular espessa composta por peptidoglicano, que lhe confere resistência estrutural (Curry, 2010).

C. difficile é uma bactéria que coloniza o intestino grosso de cerca de 4-15% dos indivíduos saudáveis, geralmente em equilíbrio com a microbiota intestinal e sem causar sintomas, e os esporos ingeridos podem ser encontrados no intestino de 1 a 3% dos indivíduos saudáveis. A colonização ocorre principalmente em condições em que a microbiota normal é alterada, como após o uso de antibióticos, que reduzem a competição com outras bactérias comensais. Ele utiliza de fatores de adesão, como adesinas e proteínas de superfície, para se fixar ao epitélio intestinal e iniciar seu processo de colonização. Além disso, *C. difficile* possui a capacidade de formar esporos em resposta a condições desfavoráveis, como escassez de nutrientes ou alterações ambientais. A esporulação é um processo essencial para a colonização intestinal por *C. difficile*, permitindo que a bactéria entre em um estado de dormência e forme esporos altamente resistentes. Esses esporos possuem uma camada protetora composta por proteínas e lipídios, o que os torna resistentes a desinfetantes, calor e radiação UV, garantindo sua persistência tanto na microbiota intestinal quanto no ambiente externo (Spigaglia, 2024). Durante esse processo, o DNA da bactéria é compactado e protegido por proteínas específicas, garantindo sua viabilidade a longo prazo. Quando ingeridos por meio de contaminação fecal-oral, os esporos germinam no trato gastrointestinal, retornando à forma vegetativa e permitindo que ela colonize o intestino, permitindo assim que atue como um reservatório para a bactéria, facilitando sua propagação entre os pacientes (Barro-Carrasco e Paredes-Sabja, 2014). A capacidade dos esporos de resistir a tratamentos convencionais, como desinfetantes e antibióticos, e sobreviver por longos períodos em superfícies e equipamentos hospitalares pode ser perigosa para pacientes hospitalizados, especialmente aqueles submetidos a tratamentos com antibióticos de amplo espectro, o que favorece a disbiose intestinal, a colonização e proliferação dessa bactéria. (Phanchana *et al.*, 2021). Estudos recentes apontam sua resistência a vários antibióticos, o que a torna uma das principais causas de diarreia infecciosa em ambientes hospitalares ao redor do mundo (Saha *et al.*, 2019). Tanto é que

foi *C. difficile* foi incluído na lista de microrganismos com nível de ameaça "urgente" pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (Hayman,2021)

A grande variabilidade genética de *C. difficile* resulta em diferentes graus de patogenicidade e resistência aos tratamentos convencionais, complicando ainda mais a gestão da CDI, o que se torna um sério problema de saúde pública (Khanna e Gerding.,2019; Antonelli *et al*, 2020). Algumas cepas de *C. difficile* produzem principalmente as toxinas A (TcdA) e B (TcdB), as quais são reconhecidas como os principais fatores de virulência responsáveis pela CDI. Suas toxinas desempenham um papel central na patogênese da doença, causando danos ao epitélio intestinal e desencadeando uma cascata de eventos inflamatórios (Sun e Hirota,2015). A presença de toxinas de *C. difficile* é um fator de risco para a recorrência da infecção após tratamento antimicrobiano (Seekatz, Safdar e Khanna, 2022). A detecção das toxinas TcdA e TcdB nas fezes dos pacientes é um dos testes de diagnóstico realizados para CDI (Caroll e Mizusawa, 2020) Várias cepas hipervirulentas de *C. difficile* emergiram, com destaque para a cepa epidêmica ribotípico 027 ou NAP1. Além de produzirem níveis bem mais elevados das toxinas A e B, produzem outra toxina conhecida como toxina binária (CDT). Essas cepas estão normalmente associadas a casos mais graves de CDI, recorrência, altas taxas de mortalidade, e resistência a quinolonas (Banawas, 2018).

Embora as toxinas A e B sejam os principais fatores de virulência de *C. difficile*, a bactéria conta com outros mecanismos que facilitam sua patogenicidade. Entre esses fatores estão adesinas de superfície, que permitem a adesão ao epitélio intestinal, e proteínas de ligação a colágeno e fibronectina, que contribuem para a fixação nas células epiteliais e na matriz extracelular. Além disso, *C. difficile* apresenta S-layers, camadas superficiais compostas por proteínas que desempenham funções na interação com o hospedeiro. A principal proteína dessa camada é a SlpA, que se organiza em um arranjo paracristalino, formando uma estrutura protetora ao redor da célula bacteriana. Essa organização facilita a adesão da bactéria ao epitélio intestinal, um passo crucial para sua colonização no intestino. As S-layers não apenas protegem *C. difficile* contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também ajudam a bactéria a se fixar nas células-alvo, facilitando sua persistência no ambiente intestinal (Lanzoni-Mangutchi *et al.*, 2022). A formação de biofilmes, que envolve a agregação das células bacterianas em uma matriz extracelular, também contribui significativamente para a colonização e resistência da bactéria, dificultando a ação de antimicrobianos e do sistema imunológico. Biofilmes são estruturas compostas por comunidades bacterianas envoltas em uma

matriz extracelular, que são compostas por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e protege a bactéria contra antimicrobianos e a ação do sistema imune, contribuindo para a persistência da infecção. Assim, a bactéria encontra um microambiente que favorece sua sobrevivência por longos períodos, mesmo na presença de tratamentos antimicrobianos. Além disso, os esporos da bactéria podem ser incorporados no biofilme, aumentando ainda mais sua resistência e promovendo infecções recorrentes (Vuotto et al., 2018).

1.2 Epidemiologia das infecções causadas por *Clostridioides difficile* (CDI)

A infecção por *Clostridioides difficile* (CDI) é um dos desafios da saúde pública na atualidade, particularmente em ambientes hospitalares e de cuidados prolongados. Reconhecida pela primeira vez como uma causa significativa de diarreia associada ao uso de antibióticos na década de 1970, a CDI tem se tornado cada vez mais prevalente nas últimas décadas, em parte devido ao aumento no uso de antibióticos de amplo espectro, que desestabiliza a microbiota intestinal permitindo a proliferação de *C. difficile* (Kathleen e Napolitano, 2014). A CDI é classificada como Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), ocorrendo principalmente em pacientes hospitalizados ou em outras instituições de saúde, como clínicas e lares de idosos. Essas infecções estão associadas a aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes internados, além de gerarem custos consideráveis para os sistemas de saúde. (Paitoonpong, Wong, e Perl, 2013; Hespanhol et al., 2019). Apesar da redução na incidência de CDI associadas a IRAS, houve um aumento expressivo nas taxas de CDI comunitária, bem como nas taxas de recorrência. Diferente das infecções hospitalares, a CDI comunitária ocorre em indivíduos sem histórico recente de hospitalização ou exposição a ambientes de saúde (Finn, Andersson, e Madin-Warburton, 2021). O surgimento da CDI comunitária é alarmante, pois além dela desafiar o conceito tradicional de que a infecção é predominantemente nosocomial, ampliando o espectro de populações em risco, pacientes mais jovens e saudáveis, sem os fatores de risco típicos, como idade avançada e comorbidades, estão agora apresentando CDI, muitas vezes sem a exposição prévia a antibióticos. Além disso, a CDI comunitária apresenta desafios adicionais no diagnóstico e tratamento, frequentemente os sintomas são confundidos com outras condições gastrointestinais comuns, levando a diagnósticos tardios e ao potencial aumento da gravidade da doença e morbidade (Negrut et al., 2020). A disseminação de cepas hipervirulentas na comunidade, como a cepa NAP1/BI/027, que é

altamente resistente e produz toxinas em maiores quantidades, aumenta o risco de complicações graves, como megacôlon tóxico e falência de múltiplos órgãos (Hunt e Ballard, 2013).

Clinicamente, as infecções por *C. difficile* podem variar em gravidade, desde quadros leves até casos graves e potencialmente fatais. Os principais sintomas incluem diarreia aquosa persistente, dor abdominal em cólica, febre, náusea e perda de apetite. Nos casos mais graves, pode ocorrer desidratação, colite pseudomembranosa, megacôlon tóxico e, em situações extremas, perfuração intestinal (Poutanen e Simor, 2004). A colite pseudomembranosa é uma inflamação grave do cólon, geralmente associada ao uso de antibióticos que alteram a microbiota intestinal, permitindo a proliferação descontrolada de *Clostridioides difficile* que libera toxinas que causam danos ao revestimento do intestino, levando à formação de placas esbranquiçadas ou amareladas chamadas pseudomembranas (Wilcox, 2003; Lawson *et al.*, 2016). A prevalência e a incidência de CDI variam amplamente ao redor do mundo. Em países como os Estados Unidos e na Europa, a incidência é alta, com estimativas de 10 a 15 casos por 10.000 pacientes internados (Finn, Andersson, e Madin-Warburton, 2021). Nos Estados Unidos, por exemplo, são registrados cerca de 500.000 casos por ano. Na América Latina, a prevalência é menor, mas acredita-se que esteja subnotificada (Turner *et al.*, 2019). Estudos indicam que a incidência de CDI nos países latino-americanos tem aumentado devido ao surgimento e disseminação de cepas epidêmicas, como RT027/NAP1/ST1, RT078/ST11 e RT017/ST37. Além disso, cepas endêmicas multirresistentes a medicamentos têm surgido recentemente, em parte devido à falta de protocolos, diagnósticos consistentes e diretrizes para o uso de antibióticos em cada país, o que contribui para a dificuldade no controle e diagnóstico da infecção (Morales-Olvera *et al.*, 2023). No entanto, a incidência vem aumentando, particularmente em países como o Brasil. Em regiões como Ásia e África, embora os dados sejam limitados, observa-se uma tendência crescente nas infecções, possivelmente devido ao aumento do uso de antibióticos. O tratamento das infecções por *C. difficile* conhecidos atualmente é a administração de antibióticos específicos para combater a bactéria, sendo o metronidazol indicado para infecções leves a moderadas, enquanto a vancomicina oral é considerada o tratamento padrão para casos moderados a graves (Kathleen e Napolitano, 2014). Um antibiótico mais recente, a fidaxomicina, tem se mostrado eficaz para infecções graves e na redução de recorrências, porém não é utilizado no Brasil (Mullane 2014). Em casos de infecções recorrentes, o transplante de microbiota fecal (TMF) tem se mostrado uma opção terapêutica eficaz, ajudando a restaurar a microbiota intestinal.

normal (Voth & Khanna, 2020). Além disso, a imunoterapia com bezlotoxumabe, um anticorpo monoclonal contra a toxina B de *C. difficile*, tem sido utilizada para reduzir o risco de recorrência (Villafuerte Gálvez e Kelly, 2017).

1.3 O microbioma do trato gastrointestinal (TGI)

A microbiota intestinal constitui um complexo ecossistema de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal humano. Essa comunidade microbiana é composta por uma diversidade impressionante de bactérias, vírus, fungos e outros microrganismos, os quais desempenham papéis essenciais para a saúde do hospedeiro, influenciando processos fisiológicos e imunológicos (Wang, Zhu e Qin, 2019). A microbiota intestinal começa a se formar logo após o nascimento e é influenciada por fatores como o tipo de parto (vaginal ou cesárea), aleitamento (leite materno ou fórmula), dieta ao longo da vida, uso de antibióticos, estilo de vida, entre outros. Esses fatores podem alterar a composição e a diversidade da microbiota, afetando diretamente a saúde intestinal e geral do indivíduo (Chong, Bloomfield e O'Sullivan, 2018). Nos últimos anos, foram feitos progressos sobre o entendimento da fisiologia e metabolismo de *C. difficile*, particularmente no que diz respeito à colonização e interação desta com a microbiota intestinal humana. Disbiose é o desequilíbrio na composição e na função da microbiota, o conjunto de micro-organismos que habitam um ambiente específico, como o intestino. Esse desequilíbrio ocorre quando há redução das bactérias benéficas e aumento de microrganismos potencialmente prejudiciais, o que pode comprometer a estabilidade do ecossistema microbiano. A disbiose pode causar inflamação, favorecer infecções e contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, afetando negativamente a saúde do hospedeiro. A presença de *C. difficile* na microbiota intestinal, quando associada à disbiose, pode representar um desafio significativo para o equilíbrio desse ecossistema e para a saúde do hospedeiro (Seekatz, Safdar e Khanna, 2022). Embora *C. difficile* possa coexistir como um comensal na microbiota intestinal, em condições de equilíbrio, o desequilíbrio microbiano reduz a capacidade da microbiota de inibir o crescimento de microrganismos oportunistas. Assim, *C. difficile* pode proliferar em níveis elevados, ultrapassando essa resistência natural e favorecendo seu papel oportunista, o que pode levar ao desenvolvimento de infecções. A colonização excessiva e proliferação desse microrganismo são acompanhadas da produção de toxinas que levam ao desenvolvimento de infecções intestinais grave (Abernathy-Close *et al.*, 2021). Logo, a manutenção do

equilíbrio da microbiota intestinal residente é fundamental para a prevenção contra a CDI, principalmente em indivíduos com comorbidades, maior idade e imunocomprometidos. Assim, o uso adequado de antibióticos, bem como o emprego de dietas equilibradas e hábitos de vida saudáveis, estão entre as principais metas da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) na área da saúde(Flandroy *et al.*, 2018). A OMS reconhece que a resistência antimicrobiana representa um desafio mundial que dificulta o controle eficiente das infecções, resultando em maiores índices de complicações, óbitos e despesas para os serviços de saúde. Por isso, a organização promove campanhas e políticas para o uso racional de medicamentos, incentivo à pesquisa em novos antimicrobianos e o fortalecimento dos sistemas de vigilância epidemiológica. Além disso, a OMS enfatiza a importância da alimentação saudável e da adoção de hábitos de vida que promovam a saúde integral, prevenindo doenças crônicas e infecções, e contribuindo para a manutenção do equilíbrio da microbiota humana. Essas ações estão alinhadas com a meta 3 dos ODS, que visa garantir uma vida saudável e promover o bem-estar para todas as idades até 2030.

1.4 A microbiota oral

Juntamente à microbiota gastrointestinal, a microbiota oral compõe o microbioma do aparelho digestivo (Le Bars *et al.*, 2017) A cavidade oral é um ambiente dinâmico e complexo, com uma variedade de nichos ecológicos, como a superfície dos dentes, mucosa oral, língua e sulcos gengivais. Cada nicho oferece condições únicas que favorecem o crescimento e a sobrevivência de uma enorme variedade de espécies microbianas (Sedghi *et al.*, 2021). Assim como no intestino, a microbiota oral residente é responsável pela manutenção da saúde bucal, e até mesmo da saúde sistêmica, como no caso de redução do nitrato a nitrito e óxido nítrico por bactérias salivares, os quais regulam várias funções fisiológicas como a pressão arterial (Thathapudi *et al.*, 2022). Apesar da resiliência da microbiota oral, fatores como má higiene bucal, dieta desequilibrada, tabagismo, uso de medicamentos e condições médicas subjacentes podem causar a disbiose desse ecossistema, favorecendo o desenvolvimento de doenças bucais, como cárie dentária, gengivite e periodontite (Jia *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da microbiota humana inicia-se logo após o nascimento, o que marca o início do processo de colonização das superfícies mucosas do recém-nascido, principalmente na boca, trato gastrointestinal e pele. Já

nos partos por cesariana, a microbiota inicial tende a ser mais diversificada e semelhante à encontrada no ambiente hospitalar, com predominância de bactérias da pele e do ambiente. Nos primeiros meses de vida, a microbiota intestinal, oral e outros microbiomas do corpo humano se desenvolvem rapidamente, sendo moldados pela alimentação, com a introdução de alimentos sólidos e, posteriormente, pela dieta variada da criança. Durante esse período, a microbiota começa a se estabilizar, mas continua a ser influenciada por fatores como o uso de antibióticos, interações sociais e a higiene (Yao et al., 2021). O biofilme proporciona uma proteção aos microrganismos contra estresses ambientais, como mudanças de pH e ação de agentes antimicrobianos, além de facilitar a comunicação entre eles por meio de moléculas sinalizadoras. Na cavidade oral, os biofilmes aderem a diferentes superfícies, como dentes, língua, gengivas, sulco gengival e mucosa oral, criando nichos ecológicos específicos que oferecem condições únicas para o crescimento microbiano, e com isso sua composição microbiana varia conforme o nicho em que se formam (Filoche, Wong & Sissons, 2010). Nas superfícies dentárias, por exemplo, predominam espécies como *Streptococcus mutans*, já conhecidas por sua associação com o desenvolvimento de cáries, devido à sua capacidade de metabolizar açúcares e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental. Por outro lado, na região subgengival, onde predominam condições anaeróbicas, destacam-se microrganismos como *Porphyromonas gingivalis*, relacionados ao desenvolvimento de doenças periodontais, como a periodontite (Murugaiyan et al., 2024).

A microbiota oral é considerada um dos microbiomas mais ricos do corpo humano. Bactérias representam a maioria dos microrganismos presentes, com os gêneros predominantes *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinomyces* e *Veillonella*. Fungos, como *Candida albicans*, podem ser encontrados em equilíbrio em indivíduos saudáveis, embora possam causar infecções oportunistas em condições de desequilíbrio (Rajasekaran et al., 2024). E vírus bacteriófagos desempenham papéis importantes na regulação da dinâmica ecológica do biofilme, enquanto archaea, como *Methanobrevibacter oralis*, embora menos estudadas, têm sido associadas a condições como a periodontite (Pilliol et al., 2024).

Os biofilmes bucais se formam de maneira altamente organizada, iniciando o processo com a fixação dos microrganismos nas superfícies da cavidade oral. Essas superfícies estão cobertas por uma fina camada originada da saliva, rica em proteínas e glicoproteínas, que serve como uma "base" para a adesão de bactérias e outros microrganismos. A primeira etapa do processo é a formação da película adquirida, que

ocorre imediatamente após a limpeza das superfícies da cavidade oral. Nessa fase, macromoléculas hidrofóbicas são absorvidas pelas superfícies, formando um filme condicionante que aumenta a eficiência na adesão bacteriana. A segunda etapa e a adesão inicial, envolvendo a aderência de microrganismos isolados à película adquirida, formando assim os colonizadores primários. A adesão pode ocorrer de maneira variável, por meio de fímbrias, adesinas e polímeros extracelulares. Nesse processo, as bactérias se multiplicam e começam a formar microcolônias, em um intervalo de 4 a 24 horas. Com o aumento da espessura do biofilme, a difusão de oxigênio e nutrientes torna-se mais difícil, o que dá início à fase de sucessão microbiana e co-agregação. Essa fase ocorre entre 1 a 14 dias, e com a diminuição do gradiente de oxigênio, surgem condições de anaerobiose estrita no interior do biofilme. Ao mesmo tempo, o gradiente de nutrientes diminui, o que leva à formação de um gradiente de fermentação, favorecendo o desenvolvimento de espécies bacterianas adaptadas a essas condições. Após 14 dias, o biofilme atinge a fase de comunidade clímax, em que ocorre um aumento significativo da diversidade bacteriana. A comunidade torna-se resiliente e estável, com as espécies estabelecendo interações complexas.

A estrutura da microbiota oral reflete também as interações dinâmicas entre os microrganismos, que podem ser colaborativas ou competitivas. Por exemplo, *Streptococcus sanguinis* produz compostos que inibem o crescimento de *S. mutans*, contribuindo para a regulação da cárie dentária. Por outro lado, microrganismos como *Fusobacterium nucleatum* atuam como mediadores na adesão de outras espécies, facilitando a formação de comunidades mais complexas. Essas interações são fundamentais para a manutenção do equilíbrio microbiano e da saúde bucal (Sakanaka et al 2022).

A saliva desempenha um papel essencial na manutenção dessa estrutura, fornecendo nutrientes, regulando o pH da cavidade oral e transportando enzimas antimicrobianas, como lisozimas e lactoperoxidases (Franca et al., 2021). O sistema imunológico local, por meio da imunoglobulina A secretória (IgA), contribui para a contenção de patógenos e para a preservação da homeostase bucal. Em conjunto, esses fatores garantem a estabilidade do ecossistema oral e evidenciam a importância da microbiota oral não apenas para a saúde local, mas também para a saúde sistêmica (Marcotte & Lavoie, 1998; Peng et al., 2022).

1.5 A microbiota periodontal e sua relação com doenças inflamatórias do TGI

A microbiota periodontal refere-se ao conjunto de microrganismos que colonizam as superfícies dentárias e os tecidos que compõem o periodonto, incluindo as regiões supragengival e subgengival. Essa comunidade microbiana está diretamente relacionada à saúde ou à inflamação dos tecidos periodontais, podendo participar tanto da manutenção da homeostase quanto do desenvolvimento de doenças como gengivite e periodontite. Em condições normais, a microbiota periodontal é composta por bactérias predominantemente benéficas, que contribuem para a formação de barreiras protetoras e a regulação da resposta imunológica local. No entanto, há fatores como má higiene oral, predisposição genética, tabagismo e condições sistêmicas, como diabetes, podem levar a uma disbiose, favorecendo um crescimento de microrganismos patogênicos. As DP estão entre as doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes em humanos, afetando entre 20% e 50% da população mundial em diferentes níveis de gravidade. Entre essas, a periodontite avançada localizada que acomete primeiros molares e incisivos representa uma forma menos comum, porém clinicamente significativa, que geralmente acomete indivíduos mais jovens (Nazir, 2017). A prevalência dessa condição varia de acordo com fatores regionais e genéticos. Estudos indicam que a prevalência de periodontite avançada em adultos jovens da zona rural do Sul do Brasil é elevada, sendo maior em indivíduos não brancos e fumantes, fatores considerados importantes indicadores de risco para o desenvolvimento da doença periodontal nessa população (Boligon, 2017). A periodontite avançada está presente em aproximadamente 11,2% da população global, sendo uma das principais causas de perda dentária em adultos (Khalifa et al., 2012). São doenças inflamatórias induzidas pela presença de um biofilme gengival patogênico (Marsh e Bradshaw, 1995), que em indivíduos suscetíveis, acabam levando à destruição dos tecidos de proteção e suporte dos dentes (gengiva, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar) (Kinanne, Stathopoulou e Papapanou, 2017). As DP incluem basicamente as gengivites e periodontites (Caton et al. 2018). A gengivite é a forma mais leve e reversível das DPs, caracterizada pela inflamação e sangramento da gengiva marginal associadas ao biofilme dental. A gengivite afeta uma grande parte da população adulta mundial, porém, é uma condição que pode ser controlada e revertida por meio de uma boa higiene bucal. (Murakami et al., 2018). Porém se a gengivite não for tratada, pode progredir para a periodontite, uma condição mais grave na qual o processo inflamatório crônico se estende além da gengiva e atinge o ligamento periodontal e o osso alveolar. Isso resulta na formação da bolsa periodontal, que é o aprofundamento patológico do sulco gengival, com reabsorção do osso alveolar e podendo levar a uma perda dentária.

(Kinanne, Stathopoulou e Papapanou, 2017). A periodontite afeta principalmente indivíduos adultos e idosos, sendo mais prevalente após os 35 anos de idade. Fatores de risco como o tabagismo, que atinge uma proporção significativa da população mundial, estão fortemente associados à progressão da doença. (Ray, 2023).

A microbiota subgengival é um ecossistema especializado que ocupa o espaço entre a superfície do dente e o sulco gengival, em contato direto com os tecidos periodontais. Esse microambiente possui condições únicas, como baixa oxigenação, presença constante de nutrientes provenientes do fluido gengival e um pH relativamente estável, fatores que moldam a composição microbiana ao longo do tempo. Em um estado de saúde, a microbiota subgengival é caracterizada por uma diversidade microbiana equilibrada, dominada por bactérias gram-positivas como *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp., que exercem funções protetoras e modulam a resposta imunológica local. No entanto, essa microbiota é extremamente adaptável, mudando rapidamente em resposta a fatores ambientais, como o acúmulo de biofilme dental, alterações no sistema imunológico ou hábitos nocivos, como o tabagismo. Essas mudanças criam um ambiente favorável à disbiose, onde bactérias patogênicas, como *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, passam a dominar. Essas bactérias possuem estratégias avançadas para sobreviver nas condições anaeróbicas do sulco gengival e escapar das defesas do sistema imunológico, o que contribui para a progressão das doenças periodontais.

Existe uma classificação proposta por Socransky e colaboradores que demonstra uma compreensão da composição e da dinâmica da microbiota subgengival, especialmente em relação ao seu papel na saúde e nas doenças periodontais. Essa classificação agrupa as espécies bacterianas presentes no biofilme gengival em complexos microbianos, que podem estar associados tanto à saúde periodontal quanto à progressão das doenças. Essa organização facilita a compreensão dos fatores que contribuem para o desenvolvimento das doenças periodontais, como a gengivite e a periodontite, que podem resultar em destruição dos tecidos de suporte dos dentes, como gengiva, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar.

A classificação inclui diferentes complexos bacterianos, sendo o complexo verde composto por bactérias que predominam em condições de saúde periodontal, como *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em sua forma não virulenta. Essas espécies desempenham um papel protetor no equilíbrio da microbiota, prevenindo o crescimento de patógenos mais agressivos. O complexo amarelo, formado principalmente por espécies de *Streptococcus*, também está

associado à saúde periodontal, sendo importante na fase inicial da formação do biofilme e na proteção contra microrganismos patogênicos. O complexo azul, composto por *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella melaninogenica*, por exemplo, é observado em condições de saúde, mas também pode ser encontrado em níveis elevados durante a inflamação gengival, participando da modulação do ambiente local. O complexo laranja, que inclui *F. nucleatum* e *Prevotella intermedia*, é considerado um grupo de bactérias "ponte", pois elas preparam o ambiente para a colonização de microrganismos mais virulentos, associando-se com a progressão da doença periodontal. O complexo vermelho, formado por espécies como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, é altamente patogênico e está fortemente associado à periodontite crônica, sendo responsável pela ativação de processos inflamatórios graves que levam à destruição dos tecidos periodontais (Socransky et al., 1998).

A implicação clínica da presença de níveis elevados de patógenos bacterianos no biofilme subgengival associado à periodontite diz respeito à forte associação entre as DPs e diversas doenças sistêmicas. Na bolsa periodontal, espécies patogênicas do biofilme subgengival podem disseminar para a circulação sanguínea (bacteremia) através do epitélio gengival ulcerado, e atingir outros sítios anatômicos do organismo humano (Martínez-García e Hernández, 2021). Da mesma forma, citocinas inflamatórias produzidas localmente em resposta a esse biofilme persistente podem ganhar a circulação sistêmica (inflamação metastática), agravando condições inflamatórias pré-existentes (Hirschfeld e Kawai, 2015). Por fim, níveis elevados de patógenos de relevância clínica, assim como patógenos periodontais podem se dispersar na saliva e ser ingeridos, alcançando a microbiota intestinal. Nesse ambiente, algumas espécies podem causar inflamação e disbiose (Welch, Ramírez-Puebla e Borisy, 2020). Todas essas rotas podem explicar alguns dos mecanismos que associam as DPs com o risco aumentado para o desenvolvimento de uma série de condições sistêmicas, tais como diabetes, doenças cardiovasculares, complicações na gravidez, artrite reumatoide, câncer colorretal, entre outras (Weidlich et al., 2008; Hajishengallis e Chavakis, 2021) A bolsa periodontal apresenta um nicho ideal para a colonização e proliferação de espécies anaeróbias, que utilizam proteínas como principal fonte nutricional. O biofilme subgengival presente na bolsa periodontal fica protegido da ação do sistema imune e da ação mecânica da higiene oral, propiciando um nicho rico para a colonização de diferentes microrganismos (Rath, Bal e Dubey, 2021). Além das espécies orais, esse biofilme associado às DPs parece servir como reservatório para vários outros patógenos de relevância médica, incluindo espécies multirresistentes, estafilococos, enterococos,

bacilos Gram-negativos entéricos, entre outros (Colombo et al., 2016; Espíndola, 2020).

Dentre as espécies orais mais abundantes no biofilme associado à periodontite, está a espécie *F. nucleatum*, um patógeno fusiforme, Gram-negativo e anaeróbio, que tem a capacidade de coagregar com diversas outras espécies. Recentemente, um estudo reportou que *F. nucleatum* tem a capacidade de se ligar à *C. difficile*, através da adesina RadD (Engevik et al., 2021). A coagregação resultou no aumento da patogenicidade de *C. difficile*, como maior produção de biofilme e toxinas. Logo, pode-se especular que pacientes com periodontite, particularmente apresentando diversos sítios com bolsa periodontal, podem ser também colonizados por *C. difficile*. Nesse contexto, pacientes com DPs podem, em determinadas condições, apresentar um risco aumentado à colonização intestinal por *C. difficile* e desenvolvimento de CDI, assim como um maior risco à recorrência da doença. Entretanto, não há dados na literatura sobre a prevalência dessa espécie no biofilme dental em condições de saúde e doença periodontal, e muito menos sobre a relação entre DPs e/ou *C. difficile* na microbiota oral e CDI.

2. JUSTIFICATIVA

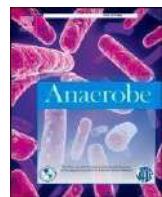
As altas taxas de incidência e recorrência de CDI associada a IRAS constituem um problema mundial grave de saúde pública, com um impacto econômico significativo no sistema de saúde devido ao aumento da estadia hospitalar, da alta morbidade e mortalidade (Phanchana et al., 2021). Somado a isso, os casos de CDI comunitário aumentaram drasticamente nos últimos anos, contribuindo para as altas taxas de morbidade (Feuerstadt, Theriault e Tillotson, 2023). A via fecal- oral é a principal rota de transmissão entre humanos, na qual a ingestão de esporos e células bacterianas presentes em superfícies permita essa colonização e proliferação no intestino de indivíduos suscetíveis (Paul, 2024). Entretanto, é possível que esse patógeno oportunista colonize a microbiota oral em determinadas condições de disbiose oral, como na presença de sítios orais com bolsas periodontais, nas quais o complexo biofilme subgengival anaeróbico se torna um reservatório de *C. difficile*. Como já mencionado, o fato de *C. difficile* co-agregar com o patógeno periodontal *F. nucleatum* reforça uma possível interação específica no biofilme subgengival, sugerindo sua capacidade de colonizar o sítio periodontal. Uma vez que ainda há lacunas de conhecimento sobre a colonização e possíveis efeitos do *C. difficile* em nichos extra-intestinais do organismo, investigar o papel de *C. difficile* no biofilme dental é fundamental para ampliar nosso conhecimento sobre a dinâmica inter-relação microbiana nesses habitats, o que irá contribuir para abordagens mais eficazes no manejo clínico dessas importantes doenças. Investigar a prevalência de *C. difficile* no biofilme dental e sua possível associação com doenças periodontais é fundamental não apenas para compreender a dinâmica desta bactéria em diferentes habitats, mas também para desenvolver estratégias de prevenção e controle mais eficazes.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como proposta investigar a presença de *C. difficile* e suas toxinas na microbiota oral e intestinal de pacientes com diferentes condições clínicas periodontais através da detecção molecular de genes específicos dessa bactéria. Além disso, correlações entre a detecção desse patógeno e suas toxinas com parâmetros clínicos periodontais e dados sócio-demográficos dessa população também foram analisadas.

4. ARTIGO PUBLICADO

Devido à publicação do meu artigo na revista *Anaerobe*, e em comum acordo com a coordenação do curso, ficou estabelecido que o referido artigo seria utilizado como parte das seções de metodologia e resultados deste trabalho, com o objetivo de demonstrar os dados obtidos durante a pesquisa.



Anaerobes in human infections (dental/oral infections)

Molecular detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in subgingival biofilm periodontitis

Isabela Leite de Oliveira Rosa, Eliane de Oliveira Ferreira, Ana Paula Vieira Colombo*



Institute of Microbiology Paulo de Góes, Department of Medical Microbiology, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. M. Rupnik

Keywords: Periodontal diseases
Dental plaque Saliva
CDI
tpi gene Toxin genes
Oral microbiota

ABSTRACT

Objectives: The oral cavity is the main gateway for the entry of *C. difficile* spores to the digestive tract. In conditions of poor oral hygiene and periodontal diseases, the dysbiotic oral microbiota may be a reservoir for several human pathogens. Here, we explored the prevalence of *C. difficile* in the oral microbiota of patients with severe periodontitis by the molecular detection of species specific genes.

Methods: Subgingival biofilm, saliva and/or feces from 659 patients with gingivitis, periodontitis and no periodontal diseases were screened for the *tpi* and toxin A/B genes specific for *C. difficile* by multiplex PCR. Differences among groups were sought by the Chi-square test.

Results: The overall frequency of *C. difficile* *tpi* gene was 29 %, with a high detection of *tcpB* gene (44.8 %). Patients with periodontitis showed a greater prevalence of this gene in the biofilm than individuals with gingivitis and periodontal health ($p = 0.001$), particularly at more severe stages of disease ($p < 0.05$). No toxin genes were detected in feces or biofilm from healthy patients, whereas >70 % of the biofilm from patients with periodontal diseases were positive for these genes ($p < 0.001$). Detection of *C. difficile* *tpi* gene in oral/fecal samples correlated with periodontal inflammation ($p < 0.05$). A modest intra-individual agreement between *tpi* gene detection in feces and saliva was found within periodontitis patients (Kappa = 0.314; $p = 0.003$).

Conclusion: The high frequency of the *C. difficile* specific genes *tpi* and *tcpB* in the dysbiotic subgingival biofilm of advanced periodontitis could support the presence of the bacterium in this niche.

1. Introduction

Clostridioides difficile infection (CDI) is one of the leading causes of healthcare-associated infections, presenting high morbidity and mortality rates [1,2]. Antibiotic use is the major risk factor for developing CDI, in addition to ageing, presence of comorbidities and immunosuppression [2,3]. The etiologic agent, *C. difficile*, is an obligate anaerobic, gram positive bacillus that inhabits the intestinal microbiota of about 4–15 % healthy adults [3,4]. This species is well known for its capacity to form spores that are extremely resilient against antimicrobial substances and hostile environments for extended periods, favoring its transmission within healthcare facilities [4]. Once ingested, the highly resistant spores gain entry into the intestinal mucosa, where germination is triggered by environmental factors such as bile salts and amino acids. Colonization is further hampered by the normal microbiota and the immune system defense mechanisms [4,5]. The primary virulence factors of *C. difficile* include toxin A (TcdA), toxin B (TcdB), and a binary

toxin called *C. difficile* transferase (CDT) [6]. In a scenario of gut dysbiosis induced by broad-spectrum antibiotics, the uncontrolled colonization and proliferation of *C. difficile* will result in toxin production, biofilm formation, and sporulation, with damage of the intestinal mucosa and disease manifestation [5].

The oral cavity is the main gateway of *C. difficile* entry to the lower gastrointestinal tract. The complex oral ecosystem provides a wide variety of colonizing niches, harboring an incredibly diverse microbiota that frequently resides within multispecies biofilms [7,8]. Dysbiosis of the dental biofilm is the primary cause of the main oral diseases in humans, caries and periodontal diseases [7]. In particular, periodontitis is a destructive form of inflammatory disease, characterized by loss of periodontal attachment and alveolar bone that support the teeth [9]. The periodontal lesion foster a rich multispecies biofilm, comprising mainly gram-negative anaerobic species [8]. Evidence has shown that the periodontitis-associated biofilm may also harbor numerous pathogens of medical relevance, including multidrug resistant enterococci,

* Corresponding author. UFRJ-Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Av. Carlos Chagas Filho, 373 Bloco I, lab. I2-03; Cidade Universitária, Rio de Janeiro, CEP 21941-902, Brazil.

E-mail address: apcolombo@micro.ufrj.br (A.P. Vieira Colombo).

staphylococci, *Helicobacter pylori* and species of the families *Pseudomonadales* and *Enterobacteriales* [10]. In this context, the anaerobic dysbiotic subgingival biofilm could also provide a niche for colonization by *C. difficile*. This pathogen was reclassified into the *Peptostreptococcaceae* family [11], which comprises taxa that are highly abundant in the subgingival microbiota of patients with periodontal diseases [12]. Conceivably, persistence of *C. difficile* vegetative cells and/or spores within the subgingival biofilm could limit the efficacy of CDI treatment with antimicrobials, becoming the periodontal lesion a potential source of oral-fecal reinfection through saliva. In previous studies, we have found *C. difficile* in the biofilm of advanced forms of periodontitis by using whole genomic DNA probes and the checkerboard method [13, 14]. However, cross-reaction with close-related species may occur when using this methodology. In the current study, we used a specific multiplex PCR for *C. difficile* genes to screen a large number of oral and fecal samples from systemically healthy individuals with different periodontal conditions. We aimed to search for relevant correlations between the presence of these specific genes and periodontal disease severity.

2. Material and methods

2.1. Study population

This retrospective observational single-center study was carried out with purified DNA samples of the biorepository of the Oral Microbiology Laboratory at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). The DNA stored in the biorepository (at -80°C) was obtained from specimens of saliva, dental plaque and feces of individuals (≥ 18 years-old) seen at the Dental School (UFRJ) from 2010 to 2024. Exclusion criteria included: <18 teeth; presence of chronic inflammatory systemic diseases; use of topical or systemic antimicrobials in the last 6 months; use of anti-inflammatory drugs in the last 3 months; history of periodontal therapy in the last 6 months; need for antibiotic prophylaxis; ongoing orthodontic treatment; pregnancy or nursing. Data on medical and dental health history, demographic and lifestyle information were also available [15]. All individuals who were sampled had signed an informed consent form. Research was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki on experimentation involving human subject. The study protocol was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital (UFRJ) by the #5.726.156.

2.2. Periodontal diagnosis

Periodontal clinical measurements were performed at six sites/tooth by trained Periodontists. Parameters measured included probing pocket depth, clinical attachment level, presence of supragingival biofilm, gingival marginal bleeding, bleeding on probing, and calculus [15]. Eligible individuals were diagnosed as presenting periodontal health, gingivitis or periodontitis, according to Da Silva-Boghossian et al. [15]. Patients with periodontitis were further classified into different levels of disease severity by the current classification guidelines [9]. Patients with any other dental needs were referred for treatment at the same Institution and instructions in proper home care procedures.

2.3. Saliva, subgingival biofilm and fecal sampling

Briefly, stimulated saliva was obtained during the morning period, at least 2 h after dental brushing and/or feeding, by chewing on a piece of paraffin. Samples were centrifuged at $14.000 \times g$ for 20 min at 4°C and pellets suspended in Tris-EDTA buffer (Sigma-Aldrich Ltda, São Paulo, Brazil) [16]. After that, selected periodontal sites were isolated, and subgingival biofilm samples were taken using periodontal scalers. Samples were obtained from 7 to 14 periodontal sites per patient, and were pooled into microtubes containing 500 μl of Tris-EDTA (Sigma) for

each individual [12]. Fecal samples (collected within 24h) were obtained within one week after clinical examination, and processed as previously described [16]. Genomic DNA was extracted from oral samples by the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Lucigen, Wisconsin, USA), and from fecal samples by the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Germantown, Maryland, USA). Purity and concentrations were determined by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry (Nano Drop Lite™, Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA).

2.4. Detection of *C. difficile* specific genes by multiplex PCR

A PCR approach targeting the species specific *tpi* (triose phosphate isomerase) and the *tcdA* and *tcdB* genes [17] was carried out in a 25 μl amplification reaction containing ~100 ng of DNA, 0.4 μM of each primer (Table S1), 12.5 μl of GoTaq® Green Master Mix 2x buffer, 0.25 μl of MgCl₂ (25 mM), and ultra-pure water (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Purified DNA from the toxigenic ATCC 9689 90556-M6S strain of *C. difficile* (*tcdA+* and *tcdB+*) was used as control in all reactions. The amplification protocol was performed in a thermocycler (T100™ Thermal Cycler, BioRad Laboratories Inc., California, USA), and included an initial denaturation step at 95°C for 3 min; followed by 39 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 45 s, 72°C for 30 s, and a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were analyzed on a DNA dye-stained (SBYR safe Invitrogen, São Paulo, Brazil) 1.5 % agarose gel electrophoresis (UltraPure Agarose, Gibco-BRL, New York, USA), and visualized on a capture-imaging system (MiniBis Pro,Bio-Imaging Systems®, Jerusalem, Israel). A 100 bp ladder was used as a standard molecular weight (Sinapse® Inc., São Paulo, Brazil).

2.5. Statistical analysis

Analyses were carried out using the SPSS 21.0 software (IBM Brasil, São Paulo, Brazil). Clinical and demographic data were counted and averaged within each group, and presented as relative frequency, mean and standard deviation. Comparisons among groups were tested by Chi-square, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The frequency of detection of *C. difficile* and the toxin A/B genes were computed for each sample and group. Significance of difference in the prevalence of these genes among groups was evaluated by the Chi-square test. Bivariate correlation analyses were performed to search for associations between clinical or demographic parameters and detection of *C. difficile* and the toxin genes. Likewise, correlations between the distribution of *C. difficile* in fecal and oral samples from the same patients were analyzed by the McNemar Chi-square and Kappa tests. The level of significance for all analyses was of 5 %.

3. Results

3.1. Clinical data

For this study, 659 patients were recruited, but not all of them provided the three biological samples. As shown in Table S2, the periodontitis group presented greater proportions of older individuals, males, smokers or former smokers, as well as individuals of low income and African background as compared to the other clinical groups ($p < 0.01$; Chi-square test). As expected, these individuals presented significantly more periodontal inflammation and tissue destruction, as well as poorer oral hygiene than individuals with gingivitis and periodontal health ($p < 0.001$; Kruskal-Wallis, Mann-Whitney tests). Within the periodontitis group, most patients presented moderate disease, stages II (24 %) and III (36 %).

3.2. Frequency of *C. difficile* genes in oral and fecal samples

The overall prevalence of the *C. difficile* *tpi* gene in any sample of the

659 patients screened was 29.1 % (detected in a total of 192 individuals), and in 94 (49 %) of those a toxin gene was present. As depicted in Fig. 1, the *tpi* gene was slightly more frequent in fecal (24/100) than oral samples (110/443 for saliva and 110/414 biofilm samples). The *tcdB* gene was the most commonly detected (46.8 %), especially in oral samples (23.6 % in saliva and 60 % in biofilm), whereas the *tcdA* gene was rarely found in biofilm and fecal samples, and not detected in saliva. Only four samples (2 biofilm and 2 fecal samples) presenting the *tpi* gene had both the toxin A and B genes (Fig. 1). Of the 192 patients presenting the *tpi* gene in any sample, 98 did not present the toxigenic A and B genes.

3.3. Distribution of *C. difficile* genes across periodontal status

The frequency of detection of *C. difficile*-associated *tpi* and toxin genes in oral and fecal samples from the clinical groups are shown in Fig. 2. In the subgingival biofilm, a significantly higher prevalence of the *tpi* gene was observed in patients with periodontitis in relation to gingivitis and periodontal health ($p = 0.001$). No differences were seen between the last two groups. In contrast, saliva samples from gingivitis patients had significantly lower prevalence of the *C. difficile* *tpi* gene than saliva from the other clinical groups ($p = 0.009$). However, the *tpi* gene was equally detected in healthy and periodontitis patients ($p > 0.05$). Although this species specific gene was more often detected in fecal samples of periodontitis patients, no significant differences were found among groups regarding the fecal microbiota ($p = 0.06$; Fig. 2A). Of interest, no *C. difficile* *tcdA* and/or *tcdB* genes were detected in feces or biofilm of healthy individuals (Fig. 2B), whereas 30 % of fecal and >70 % of biofilm samples from patients with periodontal diseases were positive for toxin genes ($p = 0.06$ and $p < 0.001$, respectively; Chi-square test). Within the periodontitis group (Fig. 3), a significantly lower prevalence of the *C. difficile* *tpi* gene was found in oral samples of patients with initial disease compared to moderate-advanced periodontitis ($p < 0.01$), but no differences were seen for fecal samples ($p > 0.05$; Chi-square test).

3.4. Correlation between clinical, demographic and socio-economic parameters and detection of *C. difficile* genes in oral and fecal samples

Associations between detection of *C. difficile* specific genes and clinical parameters of disease severity were computed for individuals with periodontitis (Table S3). The presence of the *tpi* gene was significantly associated with periodontal inflammation, as shown by the higher proportion of sites with periodontal bleeding in patients with this

gene in saliva, biofilm and/or feces ($p < 0.05$). In oral samples, detection of the *C. difficile* *tpi* gene was related to deeper periodontal pockets and attachment loss ($p < 0.001$), as well as more sites with dental plaque accumulation ($p < 0.05$; Mann-Whitney test). Socioeconomic and demographic features, which are known to affect the prevalence of *C. difficile* and the severity of periodontal diseases, were also analyzed among periodontitis patients with or without the *C. difficile* *tpi* gene. None of the parameters, including gender, race, smoking and income, which differed among clinical groups, were associated with the frequency of this gene. Of note, periodontitis patients who were positive for the *tpi* gene in subgingival biofilm were significantly younger (39.3 ± 13.3 y) than periodontitis individuals with no detectable *tpi* gene (Table S3; $p < 0.05$; Mann-Whitney test).

Considering that *C. difficile* is an intestinal pathogen, we looked for intra-individual associations between oral and fecal samples within patients with periodontitis (Table S4). There was no agreement regarding the presence/absence of the *C. difficile* *tpi* gene in feces and subgingival biofilm samples from this clinical group ($p > 0.05$), whereas a fair agreement between its detection in feces and saliva from the same patient was observed ($\kappa = 0.314$, $p = 0.003$; McNemar test = 8.64, $p = 0.003$). Moreover, the frequency distribution of the *tpi* gene in biofilm was similar to its frequency in saliva among the 273 periodontitis patients who had both oral samples ($\kappa = 0.427$, $p < 0.001$; McNemar test = 0.845, $p = 0.358$).

4. Discussion

The dysbiotic periodontitis-associated biofilm has been shown to support the growth of bacterial pathogens not commonly considered to be members of the oral microbiota, including several intestinal pathogens [10,13–15,18,19]. Here, we explored the frequency of the intestinal pathogen *C. difficile* in the oral microbiota of individuals with periodontal diseases by the molecular detection of species specific genes. A significantly greater prevalence of the *C. difficile* *tpi* and *tcdB* genes were found in patients with severe periodontitis compared to ones with no periodontal diseases and/or initial stages of periodontitis. Additional analyses showed significant associations between the presence of the *C. difficile* *tpi* gene in oral or fecal samples and clinical parameters of periodontal inflammation and attachment loss among periodontitis patients.

Despite the relevance of research on CDI pathogenesis and epidemiology, data investigating the potential oral carriage/colonization by *C. difficile* and its association with CDI recurrence and/or periodontal diseases are scarce in the literature. In one study, *C. difficile* was shown

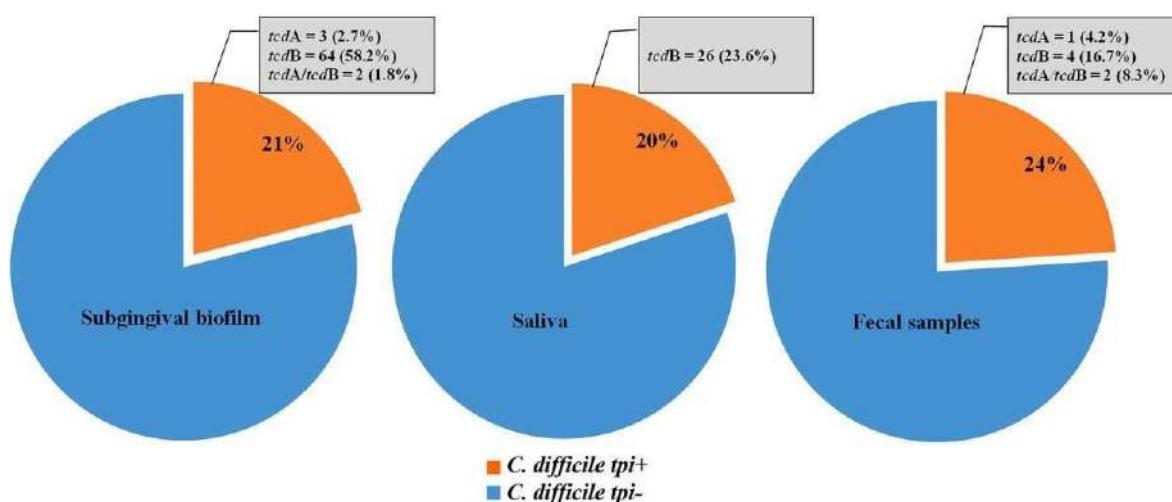


Fig. 1. Frequency distribution of *tpi* and toxin genes specific to *Clostridioides difficile* in oral and fecal samples of the study population. Among samples positive for the species specific *tpi* gene (orange slice), the frequencies of samples with *C. difficile* genes for toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) are presented.

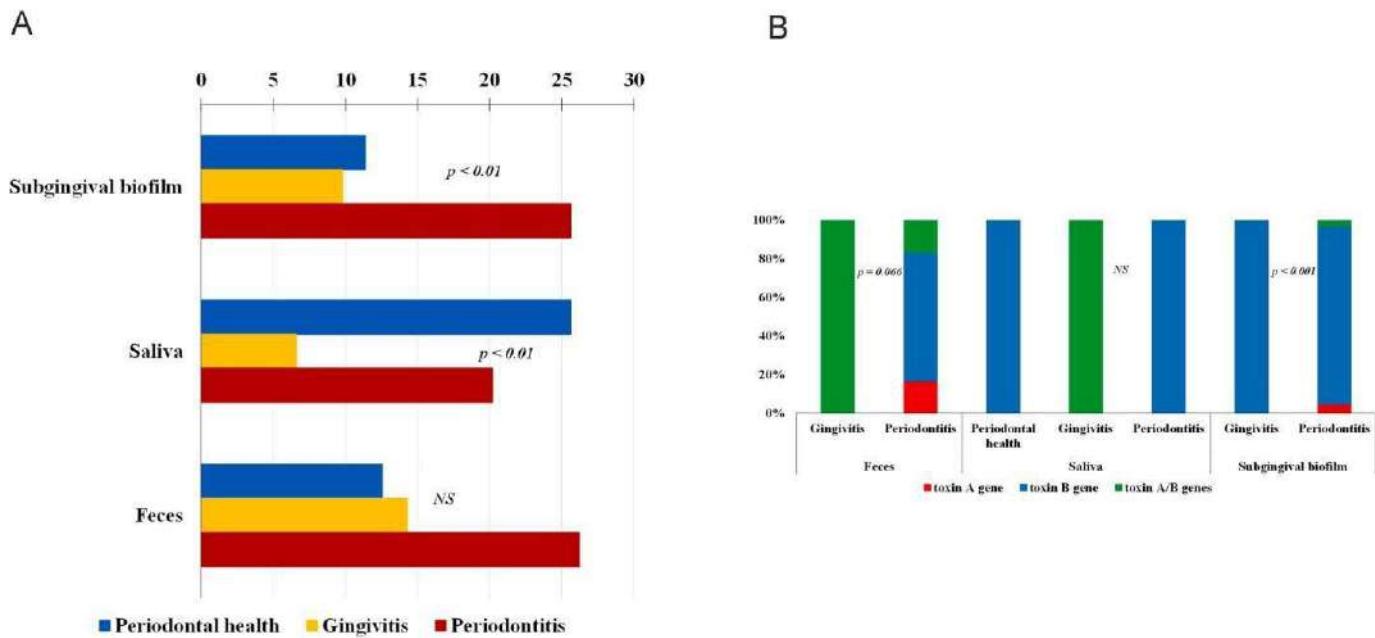


Fig. 2. Prevalence of *Clostridioides difficile* specific genes in oral and fecal samples across individuals with periodontal health, gingivitis and periodontitis. (A) Significant differences among groups on the detection of the species specific *tpi* gene were observed for oral samples (Chi-square test). (B) Frequency of the toxin A (*tcdA*) and B (*tcdB*) genes in oral and fecal samples from the three clinical groups that were positive to the *tpi* gene (Chi-square test). NS: no statistical significance.

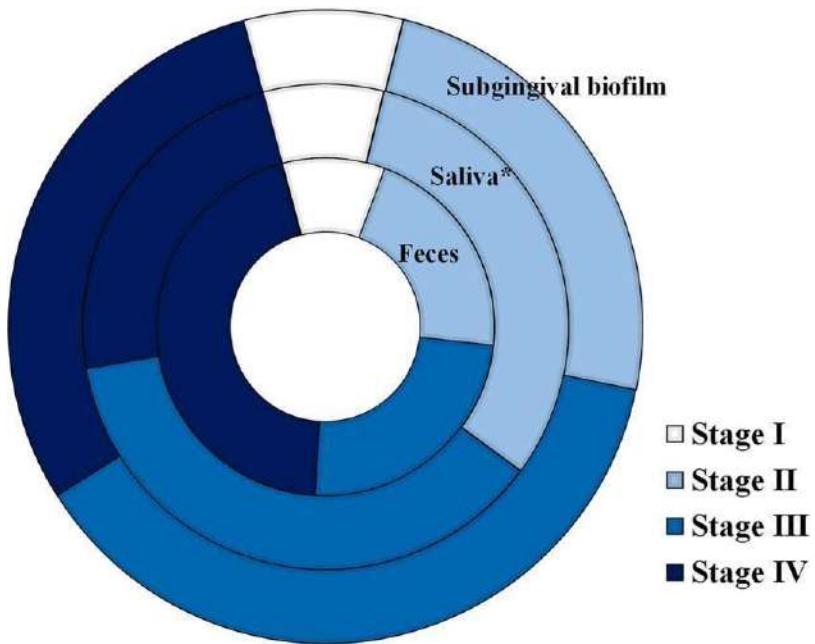


Fig. 3. Frequency of *Clostridioides difficile* *tpi* gene in oral and fecal samples of individuals with distinct stages of periodontitis. For subgingival biofilm and saliva samples, significantly higher numbers of the *tpi* gene were detected in individuals with more severe (stages III and IV) disease (* $p < 0.01$, Chi-square test). No significant differences in the detection of this gene in fecal samples were seen across disease stages.

to be among the predominant taxa in root canal infections with periapical lesions that were refractory to endodontic therapy [20]. More recently, an atypical case of *C. difficile* septicemia was reported to have a potential oral source [21]. The authors found no association between the fecal and blood strain isolates, history of comorbidities or gastrointestinal disorders. Nevertheless, a traumatic tooth extraction due to caries was informed to have occurred few days before initial symptoms of acute bacterial infection and hospital admission. These investigations,

however, did not report on the periodontal status of those patients. In our previous studies, we detected *C. difficile* in approximately 35 % of the subgingival biofilm of patients with advanced periodontitis [13,14]. Here, the frequencies of *C. difficile* *tpi* gene were lower, varying between 20.2 % (saliva) and 25.6 % (biofilm) in diseased individuals. Discrepancies among these findings may occur due to the level of disease severity investigated and the detection methods employed in the studies. The greater specificity of the PCR used in the present investigation

compared to the whole-genome DNA probe of our previous studies may explain the lower *C. difficile* detection found here. Moreover, the majority of the periodontitis patients had moderate disease, whereas in the previous investigations they presented very advanced disease (stage IV) [13,14]. For fecal samples, the frequencies observed (12.5 %–26 %) are in agreement with data reported for intestinal carriage in asymptomatic patients, although a great variability in these rates exists [3,22]. Of note, a correlation between oral and fecal carriage of *C. difficile* amongst periodontitis patients was observed for saliva, but not for biofilm samples. This may suggest that saliva may be a transitory and common carrier of *C. difficile* vegetative cells and/or spores to the gut microbiota. Several plausible factors may support the oral niche as a reservoir for this pathogen, specifically when in a dysbiotic state. In the highly anaerobic gut ecosystem, *C. difficile* forms complex biofilms involving multiple microbial interactions that may inhibit, protect or increase the virulence of this species [23,24]. Of interest, Engevik and co-workers demonstrated that *Fusobacterium nucleatum*, a major periodontal pathogen, coaggregates through the surface adhesin RadD with *C. difficile* in mucus-based biofilms, enhancing biofilm formation [25]. In another work, Smith et al. [26] showed that the intimate enterococcal-*C. difficile* interaction during CDI results in increased fitness and virulence of *C. difficile*. This species has also been associated with other taxa of the intestinal mucus layer in asymptomatic colonization and/or CDI, such as species of *Klebsiella*, *Escherichia/Shigella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, and members of the family *Pectostreptococcaceae* [22,23]. Likewise, in the strictly anaerobic and inflammatory microenvironment of the periodontal lesion, several microorganisms that are highly abundant within the dysbiotic biofilm are capable of interacting with *C. difficile*, including *Fusobacterium* spp., enterococci, gram negative bacilli, *Filifactor* spp., *Pectostreptococcus* spp., and *Veillonella* spp. [10,12–14,18,19]. Moreover, metabolites known to promote *C. difficile* expansion and toxin production, such as primary bile acids, fermentable amino acids, succinate, sialic acids, tryptophan/indole catabolites [26,27] have been reported to be elevated in gingival tissues, gingival crevicular fluid, saliva and serum of patients with periodontitis [28–30]. Formation of spores with low germination efficiency [31] within the subgingival biofilm is another feature by which *C. difficile* could persist in the oral microbiota. In the gut mucosa, *C. difficile* spores attach to extracellular matrix (ECM) proteins and internalize into intestinal epithelial and immune cells [32]. The periodontal pocket epithelium also expresses various ECM proteins that can be used as anchoring sites for *C. difficile* spores and vegetative cells [33]. The ability of *C. difficile* to internalize into non-phagocytic gingival cells could also contribute to its persistence in the periodontal pocket, as has been reported for some periodontal pathogens [34].

More than half of the biofilm samples of periodontitis patients that were positive for the *tpi* gene were also positive for the *tcpB* gene, whereas the *tcpA* gene and both toxin genes were detected in only three and two samples, respectively. In saliva and stools, the frequency of the *tcpB* gene was much lower (~17–23 %). The *tcpB* rate in biofilm is much higher than the toxigenic *C. difficile* carriage in the general population [3,22,35], but similar to frequencies described for patients with cystic fibrosis, elderly in long-term care facilities and nursing homes [3]. In Brazil, most of the CDI-associated ribotypes have a TcdA + TcdB + toxigenic profile, including the ones exclusively detected in this region [36]. However, TcdA- TcdB + strains, such as the Brazilian RT133 and the Asiatic RT017 in Argentina, are also highly prevalent in Latin America [37,38]. Unfortunately, data on the circulating toxinotypes among asymptomatic individuals are limited in this region.

After the characterization of clinical variants of TcdA- TcdB + strains from a spectrum of diseases [39], TcdB became widely accepted as the major *C. difficile* virulence factor. This cytotoxin disrupts epithelial integrity and induces tissue damage, triggering a robust pro-inflammatory response that leads to increased expression of TcdB receptors on the gut [4,6]. The synergism between TcdB and pro-inflammatory cytokines has been suggested to increase the

susceptibility to *C. difficile* colonization/infection in patients with inflammatory bowel disease (IBD) [40]. Of note, we found no toxin genes in biofilm or fecal samples from healthy individuals. Thus, the inflammatory milieu of the periodontal pocket may support a more efficient colonization and persistence of this pathogen.

Although periodontal diseases have been associated with IBD [41], data on the prevalence or incidence of CDI among patients with periodontitis are scarce. A recent study investigated the incidence of CDI in a large cohort of veterans who received antibiotics from a dentist between 2015 and 2019 [42]. Although only 0.05 % had a CDI diagnosis, approximately 80 % of the prescribed antibiotics were guideline discordant. Clindamycin was the most prescribed drug (39 %) after amoxicillin (54 %) for these individuals. Since clindamycin is highly associated with CDI onset [43], and it may still be used in preoperative prophylaxis for penicillin-allergic patients, dentists should be aware of the possibility of asymptomatic oral carriage of *C. difficile* in patients with periodontitis.

The findings of this exploratory investigation have to be seen in light of some limitations. Given the large number of samples for screening, detection of toxigenic *C. difficile* was only based on a multiplex PCR protocol targeting three genes of this species [17]. Although this is a well established and validated protocol, key elements on *C. difficile* epidemiology and pathogenesis were not determined in these oral samples, including spore counts, cell viability, toxin levels/expression and characterization of the predominant ribotypes. On the other hand, this first report on the high detection of *C. difficile* specific genes in oral samples of systemically healthy patients with advanced periodontitis may give some insights on the potential role of the dysbiotic oral microbiota as a reservoir for this pathogen. Ongoing efforts are being made to develop protocols for isolation of *C. difficile* from dental biofilm and saliva samples, as well as the applicability of other rapid diagnostic tests on oral samples from asymptomatic and CDI diagnosed patients. Further research should also investigate the association between *C. difficile* colonization in periodontitis-related biofilm and increased risk to develop CDI or recurrent CDI.

CRediT authorship contribution statement

Isabela Leite de Oliveira Rosa: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Data curation.
Eliane de Oliveira Ferreira: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation.
Ana Paula Vieira Colombo: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Data availability statement

Partial data that support the results of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Funding

This study was supported in part by the CNPq (#301618/2022-4), and FAPERJ (#E-26/200.923/2022; E-26/211.330/2021), Brazil.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors appreciate the collaboration of the postgraduate

students for the collection of biological samples; Talita Gomes B. Lourêncio and Andressa do Ros'ario for the assistance with the laboratory operations.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2025.102955>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] E. Finn, F.L. Andersson, M. Madin-Warburton, Burden of clostridioides difficile infection (CDI): a systematic review of the epidemiology of primary and recurrent CDI, *BMC Infect. Dis.* 21 (1) (2021) 456, <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06147-y>.
- [2] C. Liu, T. Monaghan, A. Yadegar, T. Louie, D. Kao, Insights into the evolving epidemiology of clostridioides difficile infection and treatment: a global perspective, *Antibiotics* 12 (7) (2023) 1141, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071141>.
- [3] L. Furuya-Kanamori, J. Marquess, L. Yakob, T.V. Riley, D.L. Paterson, N.F. Foster, C.A. Huber, A.C. Clements, Asymptomatic Clostridium difficile colonization: epidemiology and clinical implications, *BMC Infect. Dis.* 15 (2015) 516, <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1258-4>.
- [4] J.E. Buddle, R.P. Fagan, Pathogenicity and virulence of Clostridioides difficile, *Virulence* 14 (1) (2023) 2150452, <https://doi.org/10.1080/2150594.2022.2150452>.
- [5] J.K.J. Cheng, M. Unnikrishnan, Clostridioides difficile infection: traversing host-pathogen interactions in the gut, *Microbiology* 169 (2) (2023) 001306, <https://doi.org/10.1099/mic.0.001306>.
- [6] M.Z. Alam, R. Madan, Clostridioides difficile toxins: host cell interactions and their role in disease pathogenesis, *Toxins* 16 (6) (2024) 241, <https://doi.org/10.3390/toxins16060241>.
- [7] F.E. Dewhurst, T. Chen, J. Izard, B.J. Paster, A.C. Tanner, W.H. Yu, et al., The human oral microbiome, *J. Bacteriol.* 192 (19) (2010) 5002–5017, <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>.
- [8] P.D. Marsh, Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle, *J. Clin. Periodontol.* 32 (6) (2005) 7S–15S.
- [9] J.G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, I.L.C. Chapple, S. Jepsen, K.S. Kornman, et al., A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification, *J. Clin. Periodontol.* 45 (Suppl 20) (2018) S1–S8, <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>.
- [10] A.P. Vieira Colombo, C.B. Magalhaes, F.A. Hartenbach, R. Martins do Souto, C. Maciel da Silva-Boghossian, Periodontal-disease-associated biofilm: a reservoir for pathogens of medical importance, *Microb. Pathog.* 94 (2016) 27–34, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.009>.
- [11] P.A. Lawson, D.M. Citron, K.L. Tyrrell, S.M. Finegold, Reclassification of Clostridium difficile as clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) pr'evot 1938, *Anaerobe* 40 (2016) 95–99, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>.
- [12] T.G.B. Lourenço, D. Heller, C.M. Silva-Boghossian, S.L. Cotton, B.J. Paster, A.P. V. Colombo, Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients, *J. Clin. Periodontol.* 41 (2014) 1027–1036, <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>.
- [13] M.X. Silva-Senem, D. Heller, V.M. Varela, M.C.B. Torres, E.J. Feres-Filho, A.P. V. Colombo, Clinical and microbiological effects of systemic antimicrobials combined to an anti-infective mechanical debridement for the management of aggressive periodontitis: a 12-month randomized controlled trial, *J. Clin. Periodontol.* 40 (2013) 242–251, <https://doi.org/10.1111/jcpe.12052>.
- [14] A.M. de Oliveira, T.G.B. Lourenço, A.P.V. Colombo, Impact of systemic probiotics as adjuncts to subgingival instrumentation on the oral-gut microbiota associated with periodontitis: a randomized controlled clinical trial, *J. Periodontol.* 93 (1) (2022) 31–44, <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0078>.
- [15] C.M. Silva-Boghossian, R.M. Souto, R.R. Luiz, A.P. Colombo, Association of red complex, A. actinomycetemcomitans and non-oral bacteria with periodontal diseases, *Arch. Oral Biol.* 56 (9) (2011) 899–906, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.009>.
- [16] T.G.B. Lourenço, A.M. de Oliveira, G. Tsute Chen, A.P.V. Colombo, Oral-gut bacterial profiles discriminate between periodontal health and diseases, *J. Periodontal. Res.* 57 (6) (2022) 1227–1237, <https://doi.org/10.1111/jre.13059>.
- [17] L. Lemee, A. Dhalluin, S. Testelin, M.A. Mattrat, K. Maillard, J.F. Lemeland, et al., Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxicigenic culture of Clostridium difficile, *J. Clin. Microbiol.* 42 (12) (2004) 5710–5714, <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004>.
- [18] L.C.P. Espindola, R.C. Pica-o, S.M.C.N. Mançano, R. Martins do Souto, A.P. V. Colombo, Prevalence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli in subgingival biofilm associated with periodontal diseases, *J. Periodontol.* 93 (1) (2022) 69–79, <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0829>.
- [19] L.C.P. Espindola, M.V.M.R. do Nascimento, R.M. do Souto, A.P.V. Colombo, Antimicrobial susceptibility and virulence of Enterococcus spp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm, *J. Periodontol.* 92 (11) (2021) 1588–1600, <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0815>.
- [20] L.C. Henriques, L.C. de Brito, W.L. Tavares, R.P. Teles, L.Q. Vieira, F.R. Teles, et al., Microbial ecosystem analysis in root canal infections refractory to endodontic treatment, *J. Endod.* 42 (8) (2016) 1239–1245, <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.014>.
- [21] L. Wang, D. Li, Z. Chen, L. He, X. Wang, L. Tao, An atypical case of monomicrobial clostridioides difficile septicemia with No gastrointestinal manifestations, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12 (2022) 853252, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.853252>.
- [22] M. Gilboa, N. Baharav, E. Melzer, G. Regev-Yochay, D. Yahav, Screening for asymptomatic clostridioides difficile carriage among hospitalized patients: a narrative review, *Infect. Dis. Ther.* 12 (9) (2023) 2223–2240, <https://doi.org/10.1007/s40121-023-00856-4>.
- [23] E. Martinez, B. Taminiau, C. Rodriguez, G. Daube, Gut microbiota composition associated with clostridioides difficile colonization and infection, *Pathogens* 11 (7) (2022) 781, <https://doi.org/10.3390/pathogens11070781>.
- [24] L.R. Frost, J.K.J. Cheng, M. Unnikrishnan, Clostridioides difficile biofilms: a mechanism of persistence in the gut? *PLoS Pathog.* 17 (3) (2021) e1009348 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009348>.
- [25] M.A. Engevik, H.A. Danhof, J. Auchtung, B.T. Endres, W. Ruan, E. Basse, et al., *Fusobacterium nucleatum* adheres to clostridioides difficile via the RadD adhesin to enhance biofilm formation in intestinal mucus, *Gastroenterology* 160 (4) (2021) 1301–1314.e8, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.034>.
- [26] A.B. Smith, M.L. Jenior, O. Keenan, J.L. Hart, J. Specker, A. Abbas, et al., Enterococci enhance Clostridioides difficile pathogenesis, *Nature* 611 (7937) (2022) 780–786, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05438-x>.
- [27] Y. Gao, L. Ma, J. Su, Host and microbial-derived metabolites for Clostridioides difficile infection: contributions, mechanisms and potential applications, *Microbiol. Res.* 263 (2022) 127113, <https://doi.org/10.1016/j.mires.2022.127113>.
- [28] N. Takahashi, Oral microbiome metabolism: from "who are they?" to "what are they doing?", *J. Dent. Res.* 94 (12) (2015) 1628–1637, <https://doi.org/10.1177/0022034515606045>.
- [29] R. Yang, W. Yu, L. Lin, M. Jin, S. Hu, B. Jiang, et al., Profiling of bile acids and activated receptor S1PR2 in gingival tissues of periodontitis patients, *J. Periodontol.* 94 (4) (2023) 564–574, <https://doi.org/10.1002/JPER.22-0398>.
- [30] S. Oktay, O.O. Bal, L. Kuru, A. Yarat, U. Noyan, Is sialic acid a promising marker for periodontal diseases? Niger. J. Clin. Pract. 23 (5) (2020) 603–609, https://doi.org/10.4103/njcp.njc_499_19.
- [31] E.G. Semenyuk, M.L. Laning, J. Foley, P.F. Johnston, K.L. Knight, D.N. Gerding, et al., Spore formation and toxin production in Clostridium difficile biofilms, *PLoS One* 9 (1) (2014) e87757, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087757>.
- [32] P. Castro-Co'dova, P. Mora-Uribe, R. Reyes-Ramirez, G. Cofre 'Araneda, J. Orozco-Aguilar, C. Brito-Silva, et al., Entry of spores into intestinal epithelial cells contributes to recurrence of Clostridioides difficile infection, *Nat. Commun.* 12 (1) (2021) 1140, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21355-5>. Erratum in: *Nat. Commun.* 2022;13(1):2465. doi: 10.1038/s41467-022-30283-x.
- [33] L. Vitkov, M. Hannig, W.D. Krautgartner, K. Fuchs, Bacterial adhesion to sulcular epithelium in periodontitis, *FEMS Microbiol. Lett.* 211 (2) (2002) 239–246, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11231.x>.
- [34] S. Ji, Y.S. Choi, Y. Choi, Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? *J. Periodontal. Res.* 50 (5) (2015) 570–585, <https://doi.org/10.1111/jre.12248>.
- [35] I.M. Zacharioudakis, F.N. Zervou, E.E. Pliakos, P.D. Ziakas, E. Mylonakis, Colonization with toxinogenic C. difficile upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis, *Am. J. Gastroenterol.* 110 (3) (2015) 381–390, <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.22>, quiz 391.
- [36] C.N.R. Trindade, R.M.C.P. Domingues, E.O. Ferreira, The epidemiology of Clostridioides difficile infection in Brazil: a systematic review covering thirty years, *Anaerobe* 58 (2019) 13–21, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.002>.
- [37] A.N. Cirivaro, P. Carasi, I. Salto, et al., Clostridioides difficile: characterization of the circulating toxinotypes in an Argentinean public hospital, *Rev. Argent. Microbiol.* 55 (1) (2023) 73–82, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.010>.
- [38] A. Goorhuis, M.C. Legaria, R.J. van den Berg, et al., Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative Clostridium difficile in a general hospital in Buenos Aires, Argentina, *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (12) (2009) 1080–1086, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0999.2009.02759.x>.
- [39] D. Drudy, S. Fanning, L. Kyne, Toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile, *Int. J. Infect. Dis.* 11 (1) (2007) 5–10.
- [40] G. Bassotti, A. Fruganti, F. Stracci, P. Marconi, K. Fettucciarri, Cytotoxic synergism of Clostridioides difficile toxin B with proinflammatory cytokines in subjects with inflammatory bowel diseases, *World J. Gastroenterol.* 29 (4) (2023) 582–596, <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i4.582>.
- [41] Q. Wang, S. Chen, J. Zhou, L. Zhao, Bidirectional associations between periodontitis and inflammatory bowel disease: a systematic review of longitudinal

- studies with meta-analysis and trial sequential analysis. J. Periodontal. Res. 59 (6) (2024) 1083–1094, <https://doi.org/10.1111/jre.13291>.
- [42] G.M. Wilson, C.T. Evans, M.A. Fitzpatrick, L. Poggensee, G. Gibson, M.M. Jurasic, et al., Clostridioides difficile infection following dental antibiotic prescriptions in a cohort of US veterans, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 44 (3) (2023) 494–496, <https://doi.org/10.1017/ice.2021.516>.
- [43] A.C. Miller, A.T. Arakkal, D.K. Sewell, A.M. Segre, J. Tholany, P.M. Polgreen, CDC MInD-Healthcare Group, Comparison of different antibiotics and the risk for community-associated clostridioides difficile infection: a case-control study, Open Forum Infect. Dis. 10 (8) (2023) ofad413, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad413>.

Material suplementar

Table S1. Oligonucleotides sequences used in the multiplex PCR for detection of *Clostridioides difficile*.

genes	Sequences (5'-3')	Amplicons (bp)
<i>tpi</i> -F	AAA GAA GCT ACT AAG GGT ACA AA	
<i>tpi</i> -R	CAT AAT ATT GGG TCT ATT CCT AC	230
<i>tcdA</i> -F	AGA TTC CTA TAT TTA CAT GAC AAT AT	
<i>tcdA</i> -R	GTA TCA GGC ATA AAG TAA TAT ACT TT	369
<i>tcdB</i> -F	GGA AAA GAG AAT GGT TTT ATT AA	
<i>tcdB</i> -R	ATC TTT AGT TAT AAC TTT GAC ATC TTT	160

tpi: triose phosphate isomerase gene; *tcdA*: toxin A gene; *tcdB*: toxin B gene; F: forward; R: reverse. This protocol was described by Lemee *et al.* 2004 [17].

Table S2. Clinical and demographic characteristics of the study population.

Parameters	Periodontal health	Gingivitis	Periodontitis	p value
N	134	66	459	
Mean (sd) age in years #	26.6 (9.5)	29.3 (11.5)	42.0 (13.7)	<0.001
Gender (females) *	68.7%	77.3%	62.7%	0.046
Race/Color*	70.9%	53.1%	43.4%	
White	7.9%	14.1%	21.7%	<0.001
African Americans				
Mestizos/Mulattos/Others	21.3%	32.8%	34.9%	
Low monthly income *	13.2%	41.9%	57.0%	<0.001
Low education *	88.1%	88.7%	91.6%	0.202
Smokers/Former smokers *	6.7%	12.1%	19.4%	0.002
Mean (sd): #				
N of missing teeth	0.8 (2.0)	2.3 (3.6)	4.2 (4.7)	<0.001
PPD (mm)	1.7 (0.3)	1.9 (0.2)	2.8 (0.9)	<0.001
CAL (mm)	1.7 (0.4)	1.9 (0.4)	3.2 (1.3)	<0.001
Mean (sd) % sites with: #				
PPD ≥ 5 mm	0	0	13.0 (12.0)	<0.001
SB	9.21 (11.2)	34.7 (17.9)	48.3 (25.0)	<0.001
BOP	2.8 (3.1)	19.2 (15.1)	41.2 (52.0)	<0.001
GI	2.0 (2.8)	17.5 (6.5)	24.8 (18.4)	<0.001
CA	3.6 (6.3)	8.6 (15.0)	22.5 (18.2)	<0.001

Disease severity (%): [‡]	
Stage I	21.1
Stage II	24.0
Stage III	35.9
Stage IV	19.0

sd: standard deviation; PPD: probing pocket depth; CAL: clinical attachment level; SB: visible supragingival biofilm; BOP: bleeding on probing; GI: gingival bleeding index; CA: calculus. * Refers to the Chi-square test; # Refers to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. [‡] According to Caton *et al.* 2018 [9].

Table S3. Associations between periodontal clinical parameters and detection of the triose phosphate isomerase (*tpi*) gene specific for *Clostridioides difficile* in oral and fecal samples of individuals with periodontitis.

	<i>C. difficile tpi</i> gene -	<i>C. difficile tpi</i> gene +	p value*
Fecal samples			
n	63	22	
% BOP	29.0 (21.1)	41.5 (17.0)	0.003
% GI	23.4 (19.0)	32.9 (15.5)	0.009
Saliva			
n	296	75	
% BOP	37.4 (62.7)	51.3 (25.4)	<0.001
% GI	21.5 (16.6)	32.3 (19.1)	<0.001
% PPD>5mm	12.3 (18.2)	15.5 (17.7)	0.006
% CAL > 5mm	11.4 (17.3)	13.6 (17.6)	0.044
Subgingival Biofilm			
n	267	92	
% BOP	33.3 (23.4)	55.6 (27.8)	<0.001
% GI	22.7 (18.7)	30.7 (16.6)	<0.001
% PPD>5mm	10.0 (14.9)	22.4 (22.1)	<0.001
% PPD>6mm	2.6 (6.4)	8.1 (11.1)	<0.001
% SB	47.9 (22.6)	54.2 (22.9)	0.02
% CAL>5mm	8.9 (15.9)	18.9 (20.7)	<0.001
age (years)	42.9 (13.4)	39.3 (13.3)	0.02

Values refer to mean (sd) of % of periodontal sites presenting bleeding on probing (BOP), gingival bleeding (GI), probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL) and supragingival biofilm (SB). *p values for the Mann-Whitney test.

Table S4. Intra-individual correlation between the frequency of the *Clostridioides difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*) gene in oral and fecal samples from individuals with periodontitis. Values represent the observed (expected) frequencies.

Fecal samples					
	<i>C. difficile</i> (tpi -)	<i>C. difficile</i> (tpi +)	Total	Tests	
Subgingival Biofilm samples	<i>C. difficile</i> (tpi -)	54(53.1)	18(18.9)	72	Kappa = 0.073 (<i>p</i> =0.446)
	<i>C. difficile</i> (tpi +)	5(5.9)	3(2.1)	8	McNemar = 6.26 (<i>p</i> =0.012)
	Total	59	21	80	
<hr/>					
Saliva	<i>C. difficile</i> (tpi -)	41(37.8)	13(16.2)	54	Kappa = 0.314 (<i>p</i> =0.003)
	<i>C. difficile</i> (tpi +)	1(4.2)	5(1.8)	6	McNemar = 8.64 (<i>p</i> =0.003)
	Total	42	18	60	

5.DISCUSSÃO

A detecção de *C. difficile* na microbiota oral, especialmente em pacientes com periodontite, amplia significativamente nosso entendimento sobre os possíveis nichos ecológicos ocupados por essa bactéria além do trato gastrointestinal. Neste estudo, os genes *tpi* e *tcdB* de *C. difficile* foram mais prevalentes em pacientes com periodontite grave em comparação com aqueles sem doença periodontal e/ou em estágios iniciais de periodontite. Análises adicionais mostraram associações significativas entre a presença de *C. difficile* em amostras orais ou fecais e parâmetros clínicos de inflamação periodontal e perda de inserção em pacientes com periodontite. Esses dados sugerem que a disbiose da microbiota periodontal pode favorecer a colonização e a persistência dessa bactéria, podendo impactar tanto a saúde bucal quanto a sistêmica.

Apesar da relevância da pesquisa sobre patogênese e epidemiologia de CDI, estudos sobre a associação entre *C. difficile* e/ou CDI com doenças periodontais são escassos na literatura. Em um estudo, *C. difficile* demonstrou estar entre os táxons predominantes em infecções de canal radicular com lesões periapicais refratárias à terapia endodôntica (Henriques *et al.*, 2016). Mais recentemente, um caso atípico de septicemia por *C. difficile* foi relatado como tendo uma potencial fonte oral (Wang *et al.*, 2022). Em nossos estudos anteriores, detectamos *C. difficile* em aproximadamente 35% do biofilme subgengival de pacientes com periodontite avançada (Oliveira *et al.*, 2022; Silva-Senem *et al.*, 2013). No presente trabalho, as prevalências do gene *tpi* foram relativamente baixas, variando entre 20,2% na saliva e 25,6% no biofilme de indivíduos com periodontite. Discrepâncias entre esses achados podem ocorrer devido ao nível de gravidade da doença investigado e aos métodos de detecção empregados nos estudos. A maior especificidade da PCR utilizada na presente investigação, em comparação com a sonda de DNA de genoma completo de nossos estudos anteriores, pode explicar a menor detecção de *C. difficile* encontrada aqui. Além disso, a maioria dos pacientes com periodontite apresentava doença moderada, enquanto nas investigações anteriores apresentavam doença avançada (estágio IV) (Oliveira *et al.*, 2022; Silva-Senem *et al.*, 2013). Para amostras fecais, as frequências observadas (12,5% - 26%) estão de acordo com os dados relatados para a presença intestinal em pacientes assintomáticos, embora exista grande variabilidade nessas taxas (Furuya-Kanamori *et al.*, 2015; Gilboa *et al.*, 2023). Vale ressaltar que foi observada uma correlação entre a presença oral e fecal de *C. difficile* em pacientes com periodontite para a saliva, mas não para amostras de biofilme. Isso pode sugerir que a saliva pode ser um transportador transitório e comum

de células vegetativas e/ou esporos de *C. difficile* para a microbiota intestinal. Entre os genes de toxinas analisados, observamos uma predominância do gene *tcdB* no biofilme subgengival, mesmo na ausência do gene *tcdA*. Este achado é relevante, pois estudos como o de Hespanhol et al. (2019) mostram que cepas *TcdA⁻/TcdB⁺* mantêm alto potencial virulento, sendo capazes de causar quadros clínicos graves como colite pseudomembranosa. Vários fatores plausíveis podem sustentar a hipótese de que a cavidade oral funcione como um nicho para *C. difficile*, especialmente num contexto de disbiose. Embora este estudo não tenha avaliado a expressão das toxinas nem manifestações clínicas associadas, os dados moleculares obtidos, aliados aos achados de Engevik et al. (2021) que demonstraram a capacidade de *F. nucleatum* de interagir com *C. difficile* por meio da proteína de adesão RadD, reforçam a teoria de que o biofilme oral, em especial o subgengival, atue como um reservatório desse patógeno. Além disso, no microambiente estritamente anaeróbico e inflamatório da lesão periodontal, vários microrganismos altamente abundantes no biofilme disbiótico são capazes de interagir com *C. difficile*, incluindo enterococos, bacilos gram-negativos, *Filifactor* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Veillonella* spp. (Espíndola et al., 2021; Espíndola et al., 2022; Lourenço et al., 2014; Oliveira et al., 2022; Vieira Colombo et al., 2016). Além disso, metabólitos conhecidos por promover a expansão e a produção de toxinas por *C. difficile*, como ácidos biliares primários, aminoácidos fermentáveis, succinato, ácidos siálicos e catabólitos de triptofano/indol (Gao, Ma, Su, 2022; Smith et al., 2022), foram relatados como elevados em tecidos gengivais, fluido gengival crevicular, saliva e/ou soro de pacientes com periodontite (Oktay et al., 2020; Takahashi, 2015).

Neste estudo, observamos uma maior prevalência de *Clostridioides difficile* em indivíduos mais jovens, o que chama atenção por se tratar de um patógeno tradicionalmente associado a infecções intestinais em contextos hospitalares. No entanto, estudos recentes demonstram que a colonização por *C. difficile* também pode ocorrer em adultos jovens saudáveis. Uma pesquisa conduzida em Pittsburgh (EUA) com 106 indivíduos entre 24 e 30 anos identificou uma prevalência de 6,6 % de cepas toxigênicas. De forma semelhante, uma análise global com adultos saudáveis reportou taxas variando entre 0 e 15 %, com estudos japoneses indicando prevalência de até 15,4 %. Esses dados sustentam nossos achados, sugerindo que a presença de *C. difficile* na cavidade oral de jovens com periodontite pode refletir um fenômeno de colonização mais amplo e ainda pouco compreendido. Fatores como hábitos de vida, características específicas da microbiota oral ou aspectos imunológicos locais podem estar envolvidos, embora mais pesquisas sejam necessárias para elucidar esses mecanismos.

Após a caracterização das variantes clínicas de cepas TcdA-/TcdB⁺ em um amplo espectro de doenças, o gene *tcdB* passou a ser amplamente reconhecido como o principal fator de virulência de *C. difficile*, reforçando sua importância na patogênese da CDI, como demonstrado por Drudy et al. (2007). No presente estudo, esse gene foi o mais frequentemente detectado entre as amostras analisadas (46,8%), com maior prevalência no biofilme subgengival (60%) e, em menor proporção, na saliva (23,6%). Esses achados estão de acordo com estudos anteriores, como o realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que identificou uma prevalência de 12,4% de *C. difficile* toxigênico, com destaque para a presença do gene *tcdB* nas amostras positivas. Apesar de esse trabalho não ter investigado a expressão das toxinas nem os sintomas clínicos associados, os dados reforçam a importância da detecção do gene *tcdB* como um possível indicador de virulência. A toxina B é uma citotoxina que rompe a integridade epitelial e induz dano tecidual, desencadeando uma resposta pró-inflamatória robusta que leva ao aumento da expressão dos receptores TcdB no intestino(Alam; Madan, 2024; Buddle; Fagan, 2023). Sugere-se que o sinergismo entre TcdB e citocinas pró-inflamatórias aumenta a suscetibilidade à colonização/infecção por *C. difficile* em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) (Bassotti et al., 2023). Vale ressaltar que não encontramos genes de toxina em biofilme ou amostras fecais de indivíduos saudáveis. Assim, o ambiente inflamatório da bolsa periodontal pode contribuir para uma colonização e persistência mais eficientes desse patógeno. Esse padrão reforça a necessidade de investigar o papel do biofilme supragingival na presença do *C. difficile*, especialmente diante de populações vulneráveis, como pacientes com periodontite, que podem estar em maior risco de colonização e infecção Em contraste ao gene *tcdB*, o gene *tcdA* foi raramente identificado, ausente nas amostras de saliva e presente apenas em alguns casos de biofilme e fezes. Apenas quatro amostras (duas de biofilme e duas fecais) apresentaram simultaneamente os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*. Destaca-se ainda que 98 dos 192 pacientes positivos para o gene *tpi* não apresentaram nenhum dos genes de toxinas A ou B, o que pode indicar colonização por cepas não toxigênicas em uma parcela considerável da população estudada. No Brasil, a maioria dos ribotipos associados à CDI apresenta um perfil toxigênico TcdA+ TcdB+, incluindo aqueles detectados exclusivamente nessa região(Trindade et al., 2019). No entanto, cepas TcdA-TcdB+, como a brasileira RT133 e a asiática RT017 na Argentina, também são altamente prevalentes na América Latina (Crivaro et al., 2023; Goorhuis et al., 2009). Infelizmente, os dados sobre os toxinótipos circulantes entre indivíduos assintomáticos são limitados nessa região. Embora as doenças periodontais tenham sido associadas

doenças inflamatórias intestinais(Wang *et al.*, 2024), dados sobre a prevalência ou incidência de CDI entre pacientes com periodontite são escassos. Um estudo recente investigou a incidência de CDI em uma grande coorte de veteranos que receberam antibióticos de um dentista entre 2015 e 2019 (Wilson *et al.*, 2023). Embora apenas 0,05% tivessem um diagnóstico de CDI, aproximadamente 80% dos antibióticos prescritos eram discordantes das diretrizes. A clindamicina (39%) foi o medicamento mais prescrito após a amoxicilina (54%) para esses indivíduos. Como a clindamicina está altamente associada ao início de CDI (Miller *et al.*, 2023), e ainda pode ser usada na profilaxia pré-operatória para pacientes alérgicos à penicilina, os dentistas devem estar cientes da possibilidade de transporte oral assintomático de *C. difficile* em pacientes com periodontite. Os resultados desta investigação exploratória devem ser vistos à luz de algumas limitações. Dado o grande número de amostras para triagem, a detecção de *C. difficile* toxigênico foi baseada apenas em um protocolo de PCR multiplex direcionado a três genes desta espécie (Lemee *et al.*, 2004). Embora este seja um protocolo bem estabelecido e validado, elementos-chave sobre a epidemiologia e patogênese de *C. difficile* não foram determinados nestas amostras orais, incluindo contagens de esporos, viabilidade celular, níveis/expressão de toxinas e caracterização dos ribotipos predominantes. Por outro lado, este primeiro relato sobre a alta detecção de genes específicos de *C. difficile* em amostras orais de pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite avançada pode fornecer alguma perspectiva sobre o papel potencial da microbiota oral disbiótica como um reservatório para este patógeno. No entanto, ainda há a necessidade de estudos adicionais, focando no isolamento da bactéria presente nas amostras orais em meio de cultura, a fim de caracterizar suas cepas, validar sua presença ativa nas amostra de saliva e biofilme, principalmente de pacientes com periodontite, fundamental para compreender melhor o comportamento da bactéria nesse novo sitio. Pesquisas futuras também devem investigar a associação entre a colonização por *C. difficile* no biofilme relacionado à periodontite e o aumento do risco de desenvolver CDI ou CDI recorrente. Os resultados deste trabalho ampliam a compreensão sobre a diversidade de nichos que podem abrigar *C. difficile*, sugerindo que a cavidade oral pode funcionar como um reservatório adicional ou até mesmo representar uma via alternativa de transmissão, especialmente em contextos de disbiose. A validação e o aprofundamento desses achados poderão subsidiar estratégias mais eficazes de vigilância, prevenção e controle, tanto na área odontológica quanto no âmbito médico-hospitalar. Recomenda-se aprofundar as investigações sobre a dinâmica de *C. difficile* na microbiota oral, suas interações com patógenos periodontais, e sua

potencial influência na etiopatogenia de infecções associadas, contribuindo para estratégias mais eficazes de vigilância, controle e manejo dessas infecções em saúde bucal e geral.

6. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo demonstram que, por meio da detecção molecular de genes específicos, o patógeno entérico *Clostridiooides difficile* portador do gene da toxina B pode ser identificado com frequência considerável no biofilme subgengival e na saliva de pacientes com periodontite avançada. A presença dessa espécie em sítios orais apresentou correlação positiva e estatisticamente significativa com inflamação gengival, acúmulo de biofilme dental e perda de inserção periodontal. Esses resultados sugerem que a cavidade oral, especialmente em contextos de doença periodontal, pode atuar como um reservatório relevante para *C. difficile*, reforçando a importância de considerar a boca como sítio extraintestinal de colonização desse patógeno.

7 REFERÊNCIAS

- ABERNATHY-CLOSE, L. et al. Intestinal inflammation and altered gut microbiota associated with inflammatory bowel disease render mice susceptible to *Clostridioides difficile* colonization and infection. *Mbio*, v. 12, n. 3, p. 10-1128, 2021.
- BARRA-CARRASCO, J.; PAREDES-SABJA, D. *Clostridium difficile* spores: a major threat to the hospital environment. *Future Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 475-486, 2014.
- BOLIGON, A. A. Prevalência e fatores associados à periodontite avançada em adultos jovens da zona rural do Sul do Brasil. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- CURRY, S. *Clostridium difficile*. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 1, p. 329-342, 2010. DOI: 10.1016/j.cll.2010.04.001.
- FEUERSTADT, P.; THERIAULT, N.; TILLOTSON, G. The burden of CDI in the United States: a multifactorial challenge. *BMC Infectious Diseases*, v. 23, n. 1, p. 132, 2023.
- FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 1, p. 8-18, 2010.
- FLANDROY, L. et al. The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. *Science of the Total Environment*, v. 627, p. 1018-1038, 2018.
- FRANCA, A. A. L. et al. A importância da saliva para a manutenção da saúde bucal: uma revisão da literatura. *Scientia Generalis*, v. 2, supl. 1, p. 34, 2021.
- FURUYA-KANAMORI, Luis et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, p. 516, 14 nov. 2015. DOI: 10.1186/s12879-015-1258-4.
- GALDYS, A. L. et al. Prevalence and duration of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage among healthy subjects in Pittsburgh, Pennsylvania. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, 2014. DOI: 10.1128/jcm.00222-14.
- HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology*, v. 21, n. 7, p. 426-440, 2021.
- HAYMAN, N. A. Reducing Hospital-Acquired *Clostridium difficile* Infection with the Centers for Disease Control Targeted Assessment for Prevention. Dissertação (Doutorado) — Grand Canyon University, 2021.
- HESPAÑOL, L. A. B. et al. Infection related to health care in an adult intensive care unit. *Enfermería Global*, v. 18, n. 1, p. 242-254, 2019.
- HIRSCHFELD, J.; KAWAI, T. Oral inflammation and bacteremia: implications for chronic and acute systemic diseases involving major organs. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, v. 15, n. 1, p. 70-84, 2015.

- JIA, G. et al. The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. *British Dental Journal*, v. 224, n. 6, p. 447-455, 2018.
- KHALIFA, N. et al. Factors associated with tooth loss and prosthodontic status among Sudanese adults. *Journal of Oral Science*, v. 54, n. 4, p. 303-312, 2012.
- KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017.
- LE BARS, P. et al. The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 63, n. 6, p. 475-492, 2017.
- MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.
- MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 169-175, 1995.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, M.; HERNÁNDEZ-LEMUS, E. Periodontal inflammation and systemic diseases: an overview. *Frontiers in Physiology*, v. 12, p. 709438, 2021.
- MORALES-OLVERA, C. G. et al. *Clostridioides difficile* in Latin America: An Epidemiological Overview. *Current Microbiology*, v. 80, n. 11, p. 357, 2023.
- MULLANE, K. Fidaxomicin in *Clostridium difficile* infection: latest evidence and clinical guidance. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, v. 5, n. 2, p. 69-84, 2014.
- MURUGAIYAN, V. et al. Defining *Porphyromonas gingivalis* strains associated with periodontal disease. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 6222, 2024.
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, v. 11, n. 2, p. 72, 2017.
- PAITOONPONG, L.; WONG, C. K. B.; PERL, T. M. Healthcare-associated infections. In: *Infectious Disease Epidemiology Theory and Practice*, p. 369-466, 2013.
- PAUL, J. Gastrointestinal Tract Infections. In: *Disease Causing Microbes*, Cham: Springer International Publishing, p. 149-215, 2024.
- PENG, X. et al. Oral microbiota in human systematic diseases. *International Journal of Oral Science*, v. 14, n. 1, p. 14, 2022.
- PHANCHANA, M. et al. Frontiers in antibiotic alternatives for *Clostridioides difficile* infection. *World Journal of Gastroenterology*, v. 27, n. 42, p. 7210, 2021.
- PILLIOL, V. et al. *Methanobrevibacter oralis*: a comprehensive review. *Journal of Oral Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 2415734, 2024.

RAJASEKARAN, J. J. et al. Oral microbiome: a review of its impact on oral and systemic health. *Microorganisms*, v. 12, n. 9, p. 1797, 2024.

RATH, S.; BAL, S. C. B.; DUBEY, D. Oral biofilm: development mechanism, multidrug resistance, and their effective management with novel techniques. *Rambam Maimonides Medical Journal*, v. 12, n. 1, 2021.

RAY, R. R. Periodontitis: an oral disease with severe consequences. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 195, n. 1, p. 17-32, 2023.

SAHA, S. et al. Increasing antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe*, v. 58, p. 35-46, 2019.

SAKANAKA, A. et al. *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. *Msystems*, v. 7, n. 4, e00170-22, 2022.

SEDGHI, L. et al. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology 2000*, v. 87, n. 1, p. 107-131, 2021.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.

SPIGAGLIA, P. *Clostridioides difficile* and Gut Microbiota: From Colonization to Infection and Treatment. *Pathogens*, v. 13, n. 8, p. 646, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13080646.

THATHAPUDI, J. J. et al. Ammonification in the oral microbiome with plausible link to diet and health and their systemic role in the salivary entero-nitrate channel—A reality or farce. In: *Development in Wastewater Treatment Research and Processes*, p. 415-428. Elsevier, 2022.

TO, K. B.; NAPOLITANO, L. M. *Clostridium difficile* infection: update on diagnosis, epidemiology, and treatment strategies. *Surgical Infections*, v. 15, n. 5, p. 490-502, 2014.

TURNER, N. A. et al. Epidemiologic trends in *Clostridioides difficile* infections in a regional community hospital network. *JAMA Network Open*, v. 2, n. 10, e1914149, 2019.

VILLAFUERTE GÁLVEZ, J. A.; KELLY, C. P. Bezlotoxumab: anti-toxin B monoclonal antibody to prevent recurrence of *Clostridium difficile* infection. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, n. 7, p. 611-622, 2017.

VOTH, E.; KHANNA, S. Fecal microbiota transplantation for treatment of patients with recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 18, n. 7, p. 669-676, 2020.

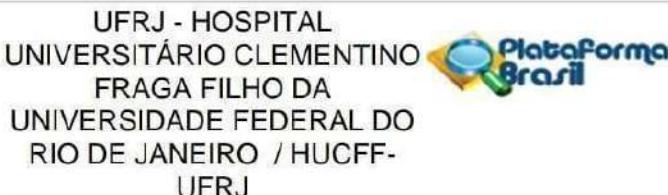
WEIDLICH, P. et al. Association between periodontal diseases and systemic diseases. *Brazilian Oral Research*, v. 22, p. 32-43, 2008.

WELCH, J. L. M.; RAMÍREZ-PUEBLA, S. T.; BORISY, G. G. Oral microbiome

geography: micron-scale habitat and niche. *Cell Host & Microbe*, v. 28, n. 2, p. 160-168, 2020.

YAO, Y. et al. The role of microbiota in infant health: from early life to adulthood. *Frontiers in Immunology*, v.12,p.708472,2021.

ANEXO



PARECER CONSUBSTANIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: C. difficile na placa dental de doenças gengivais

Pesquisador: Ana Paula Vieira Colombo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64210722.0.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.726.156

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do projeto", "Objetivo da pesquisa" e "Avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2021336.pdf datado em 15/10/2022.

INTRODUÇÃO:

O Microbioma Humano: Quando tudo começou

Nos últimos dois milhões de anos, seres humanos e microrganismos comensais co-evoluíram numa relação complexa de dependência (1). Esses microrganismos, seu genoma e o ecossistema no qual co-habitam formam o microbioma humano (2). Sabe-se que o corpo humano é colonizado por um número dez vezes maior de microrganismos do que células próprias, estando a maioria destes localizada no trato gastrointestinal. A colonização microbiana do ser humano se inicia logo ao nascimento e continua por toda vida do indivíduo, apresentando alterações relativamente sutis em resposta a diversos fatores ambientais, comportamentais e genéticos, uso de medicamentos e dieta. (3-5). Durante todo o nosso desenvolvimento, o microbioma participa de forma ativa e dinâmica na fisiologia do organismo, exercendo funções importantes, como proteção contra a colonização por patógenos exógenos, processamento de nutrientes, produção de compostos

Endereço: Rua Prof. Rodolfo Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E, sala 35

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Página 01 de 12

1. De acordo com o Item X-1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos.
2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

RIO DE JANEIRO, 12 de Junho de 2014

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

**UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO / HUCFF-
UFRJ**



Continuação do Parecer: 5.726.156

Outros	_consentimento_livre_e_esclarecido_se_m_assinatura.pdf	12:34:38	Colombo	Aceito
Outros	Link_curriculos_lattes_pesquisadores.docx	21/09/2022 12:30:13	Ana Paula Vieira Colombo	Aceito
Outros	Lista_de_documentos_anexados.docx	21/09/2022 12:29:25	Ana Paula Vieira Colombo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	protocolo_de_pesquisa_detalhado.docx	21/09/2022 12:26:30	Ana Paula Vieira Colombo	Aceito
Orçamento	orcamento_detalhado.docx	21/09/2022 12:24:42	Ana Paula Vieira Colombo	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	21/09/2022 12:24:05	Ana Paula Vieira Colombo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 27 de Outubro de 2022

**Assinado por:
Monique Loureiro
(Coordenador(a))**

Endereço:	Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E, sala 35		
Bairro:	Cidade Universitária		
UF: RJ	Município:	RIO DE JANEIRO	
Telefone:	(21)3938-2480		CEP: 21.941-913
	Fax: (21)3938-2481		E-mail: cep@hucff.ufrj.br