



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
DOUTORADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

MARIA LUANA GAUDENCIO DOS SANTOS MORAIS

ESTUDO COMPARATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE CEPAS DE
Clostridioides difficile MLST CLADO 2 (ICC45/CE e NAP1/027)

FORTALEZA

2022

MARIA LUANA GAUDENCIO DOS SANTOS MORAIS

**ESTUDO COMPARATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE CEPAS DE
Clostridioides difficile MLST CLADO 2 (ICC45/CE e NAP1/027)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M826e **Morais, Maria Luana Gaudencio dos Santos.**
 Estado Comparativo da Formação de Biofilme de Cepas de Clostridioides difficile MLST Clado 2 (ICC45/CE e NAP1/027) / Maria Luana Gaudencio dos Santos Moraes. – 2023.
 74 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2023.
 Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.
1. Clostridioides difficile. 2. infecções. 3. biofilmes. 4. recorrência. I. Título.

CDD 611

MARIA LUANA GAUDENCIO DOS SANTOS MORAIS

**ESTUDO COMPARATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE CEPAS DE
Clostridioides difficile MLST CLADO 2 (ICC45/CE e NAP1/027)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e Tecidual.

Aprovada em: 21/09/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Eliane de Oliveira Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cecília Leite Costa
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dra. Hildenia Baltasar Ribeiro Nogueira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico a realização deste sonho, primeiramente, a Deus por ter me dado forças para vencer os percalços da vida. À minha mãe, Maria Gaudencio, pelo exemplo de perseverança e apoio em todos os momentos da minha vida. E ao meu marido Samuel Morais, por toda sua compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela sua infinita bondade, amor e por me dar esperanças, forças, coragem durante toda a minha vida.

A Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais pelos conhecimentos e experiências proporcionados.

Aos órgãos de fomento, Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa auxílio e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A minha orientadora Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito por ter me acolhido, por toda dedicação e pelos ensinamentos.

A Profa Dra. Eliane Ferreira (Lili) por ter aceitado fazer parte desse trabalho, por todo apoio e principalmente por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Muito obrigada, por ter guiado meus passos no início dessa caminhada, em uma área que era totalmente nova para mim.

A Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, por ter entrado na minha vida neste momento final e ter me ajudado tanto na correção do artigo e com outras orientações. Agradeço também aos demais professores do departamento de morfologia (NEMPI) e da Pós-graduação que de alguma forma contribuíram com o meu aprendizado.

A Prof^a Dra. Cecília Leite Costa, pelo direcionamento, auxílio e por toda sua disponibilidade em ajudar.

A Prof^a Dra Hildenia Baltasar Ribeiro Nogueira, pelas correções e tempo disponibilizado.

A Prof^a Dra. Deiziane Viana da Silva Costa, por ter contribuído com as correções na tese, e enriquecimento deste trabalho.

Ao meu marido Samuel Moraes pelo companheirismo, apoio, conselhos e motivação. Você traz luz para a minha vida, sua calma e suporte foram imprescindíveis ao longo de toda jornada. Também sou grata pela vida da minha sogra Lucineide e meus cunhados Jefferson e Wellington pelo suporte e almoços partilhados.

A minha família, minha mãe por ser um exemplo, você foi um espelho de força e garra. Muito obrigada por todo apoio de sempre. Ao meu irmão Bruno e Nayane por terem colocado no mundo a Maria Eduarda, minha sobrinha querida que sempre trouxe muita alegria para minha vida.

Ao laboratório de Bacteriologia da UFC, representado pelas Professoras Dra. Débora Castelo Branco e Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes por toda ajuda, acolhimento e direcionamento. Também gostaria agradecer a todos os representantes do Laboratório, Jaiane, Vinicius, Ivan, Juliana, Alyne, Carliane, Manu, Késia, Ana Carla, Expedito, Lara, Paulo, Rodrigo, Bruno, Thiago, Jardel e David, obrigada pela partilha de conhecimento e por todo auxílio.

Ao laboratório de biologia de anaérobios na UFRJ, representado pelos professores, Dra. Eliana Ferreira, Dr. Leandro Lobo e Dra. Regina Pilotto por terem me recebido de braços abertos, pelo aprendizado e por todos os momentos especiais. Também gostaria de agradecer a toda a família de Anaérobios, Adrielle Cristina, Scarlate, Mayara Gil, Renata, Suzanna Leite, Quin, Camilla, Carla, Marcela, Giovana, Drika, Juliana, Scarlathe Costa, Luiz, Lucindo, Nicole, Amanda, Andressa, Heide, Felipe, Andressa, Juliana, Lohane, Gabriel. Muito obrigada pelo acolhimento e por fazerem sentir como parte dessa família.

A Mayara Gil do Castro Santos, agradeço por ter me ensinado a dar os primeiros passos nesse novo mundo da microbiologia, você foi fundamental para este trabalho.

Aos queridos amigos que estiveram comigo aos longos destes quatro anos, vocês foram essenciais durante este percurso. Obrigada pelo apoio, risadas, cafés, sessões de terapia e vários momentos partilhados. Especialmente Jaiane Brasil, Khetyma, Kayse Najara e Karina Antunes. Vocês foram sensacionais na minha vida, e ter vocês por perto, foi importante para eu chegar até aqui, gratidão por tudo. Adoro vocês.

A Luciana Mascena, uma amiga querida, que me mostrou um novo caminho a seguir, muito obrigada pela amizade, suporte e conselhos.

A Minha querida companheira e amiga Josy (Conceição), sou grata por ter partilhado tantos momentos divertidos, momentos de desabafos e por todos os aprendizados.

A Letícia Terceiro pelo suporte nos experimentos e por estar sempre disposta a ajudar.

A Lucas Lima pelo suporte e amizade, por sua prontidão em me ajudar e sempre me ouvir.

Ao Núcleo de Estudos e Microscopia de imagens (NEMPI) e a todos amigos especiais que eu fiz neste laboratório, muito obrigada, Flavinha, Junior, Ludmila, Ismael de Paula, Sandro Max, Lucianny Lima, Andrea Viana, Matheus Brandão, Bruno Ferreira, Dennis, Tâmara, Rafaela, Guilherme, Paulo vocês fazem a diferença na vida das pessoas.

A Laísa, por sempre nos manter informado dos assuntos da Pós-graduação, pela amizade e momentos partilhados.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da UFC, Sr. Gomes, Dona Lana, Gilearde, Régis e Ivan pela solicitude.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha caminhada no doutorado e conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

“Primeiro diga a si mesmo o que você seria; então faça o que você tem que fazer.” (Epicteto)

RESUMO

Uma das dificuldades para tratar a infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) é que essa bactéria, possui diversos fatores de virulência, dentre estes a formação de biofilmes, conhecido por promover a resistência a antibióticos e, conseqüentemente, uma maior recidiva da doença. O objetivo desse estudo foi comparar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* da cepa de *C. difficile* ICC-45 (ribotipo SLO231/UK[CE]821/ST41 IXb) isolada no estado do Ceará, Brasil, com cepas epidêmicas LIBA5756 (NAP1/027/ST01), isolada durante um surto de 2010 na Costa Rica, e R20291 (NAP1/027/ST01). Uma cepa não toxigênica, ATCC700057, foi usada como cepa controle. Após 24, 48, 72 ou 120h de cultivo, analisou-se a biomassa total do biofilme através da coloração com cristal violeta e a espessura da matriz do biofilme por meio da análise de amostras coradas com o marcador de matriz de biofilme FilmTracer™ SYPRO™ Ruby. Em adição, investigou-se a arquitetura da matriz do biofilme por microscopia eletrônica de varredura, a expressão dos genes de virulência (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*, *spo0A*, *slpA*, *cwp66* e *cwp84*) por RT-qPCR, os níveis proteicos de toxina A (TcdA) por imunofluorescência, e a susceptibilidade dos biofilmes aos antibióticos metronidazol (MTZ) e vancomicina (VAN). Todas as cepas testadas formaram um biofilme moderado $1.1 < DO_{570nm} > 3,5$. Após 72h, a biomassa do biofilme das cepas epidêmicas NAP1/027/ST01 (LIBA5756 e R20291) foi significativamente maior do que o biofilme da ICC-45 e ATCC 700057, o que foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura e confocal. Após 120h, a biomassa do biofilme LIBA5756 apresentava-se menor em comparação com outras cepas. Após 72h, o biofilme ICC-45 apresentou maior expressão de genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *slpA* and *spo0A* do que os biofilmes das cepas toxigênicas R20291 ou LIBA 5756. No entanto, não houve diferença significativa nos níveis de expressão de *cdtB*, *cwp66* e *cwp84*. VAN e MTZ inibiram a formação de biofilme em cepas epidêmicas, entretanto, para a cepa ICC-45, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de VAN e CIM e 4CIM de MTZ não foram capazes de inibir a formação de biofilme. Em conclusão, as três cepas pertencentes ao MLST Clado 2 de diferentes ribotipos, dois deles isolados da América Latina, são bactéria formadora de biofilme competente, indicando um fitness bacteriano que pode favorecer na recorrência da infecção por *C. difficile*, tornando os tratamentos mais difíceis.

Palavras-chave: *Clostridioides difficile*; infecção; biofilmes; recorrência.

Abstract

One of the difficulties in treating *Clostridioides difficile* infection (CDI) is that this bacterium forms biofilms, an important virulence mechanism known to promote antibiotic resistance and, as a result, consequently, a greater recurrence of the disease. The goal of this study was to compare the *in vitro* ability of three MLST Clade 2: ICC-45 (ribotype SLO231/UK[CE]821) a ST41 toxinotype IXb isolated in Brazil, to epidemic NAP1/027/ST01 strains NAP1/027/ST01 (LIBA5756), isolated during a 2010 outbreak in Costa Rica, and the reference epidemic strain NAP1/027/ST01 (R20291). ATCC700057, a non-toxigenic strain, was used as a control strain. Total biofilm biomass estimated by crystal violet staining was used to calculate strains' ability to form biofilm. In addition, samples were stained with the Film Tracer biofilm matrix (Invitrogen®) and the thickness of the biofilm matrix was measured using confocal microscopy. Scanning electron microscopy was used to determine matrix architecture. Confocal microscopy was used to detect the presence of toxin A (TcdA) using an anti-*Clostridioides difficile* TcdA antibody. We also looked at the expression of virulence genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*, *spo0A*, *slpA*, *cwp66* and *cwp84*), as well as the effect of antibiotics metronidazole (MTZ) and vancomycin (VAN) on biofilm growth. All the strains tested formed a moderate biofilm $1.1 <DO_{570nm}> 3.5$. After 72h, the epidemic NAP1/027/ST01 strains (LIBA5756 and R20291) biofilm biomass were significantly higher than ICC-45 and ATCC 700057 biofilm, which was corroborated by electron and confocal microscopy. At 120h, the LIBA5756 biofilm biomass decreased compared to other strains. ICC-45 had higher expression of genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *slpA* and *spo0A* than the toxigenic strains R20291 or LIBA 5756, however there were no significant difference in the expression levels of *cdtB*, *cwp66* and *cwp84*. VAN and MTZ caused an inhibitory effect in biofilm formation in epidemic strains, however for ICC-45 strain, minimal inhibitory concentration (MIC) of VAN and MIC and 4MIC of MTZ did not inhibit biofilm formation. In conclusion, the three MLST Clade 2 from different rybotypes, two of them isolated from Latin America, are o competent biofilm-forming bacterium, indicating a bacterial fitness that may favor the recurrence of *C. difficile* infection, making treatments more difficult.

Keywords: *Clostridioides difficile*; infection; biofilm; recurrence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 <i>Clostridioides difficile</i> aspectos históricos	11
1.2 <i>Clostridioides difficile</i> e suas características	12
1.3 Fisiopatologia da ICD.....	14
1.4 Epidemiologia do <i>Clostridioides difficile</i>	17
1.5 Fatores de Virulência de <i>C. difficile</i>	19
1.5.1 Toxinas.....	19
1.5.2 Endosporos	21
1.5.4 Adesinas.....	23
1.6 Biofilmes	24
1.6.1 Formação e desenvolvimento de biofilmes	25
1.6.2 Biofilmes e <i>C. difficile</i>	27
1.6.3 Antibioticoterapia e Biofilmes.....	31
2 PROPOSIÇÃO	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 CAPÍTULO	34
4 CONCLUSÃO GERAL	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Clostridioides difficile* aspectos históricos

Clostridioides difficile (*C. difficile*) foi descrito pela primeira vez em 1935 por Hall e O'Tolle, após ter sido isolado das fezes de recém-nascidos (IVAN C. HALL AND O'TOOLE 1935), sendo considerado como parte da microbiota normal. Foi originalmente denominado de *Bacillus difficilis* em decorrência da sua morfologia celular em formato de bacilo e dificuldade do seu isolamento. Hall e O'Tolle descobriram que esse microrganismo produzia uma toxina que era letal, quando administrada via intraperitoneal em alguns animais, como porquinhos da Índia.

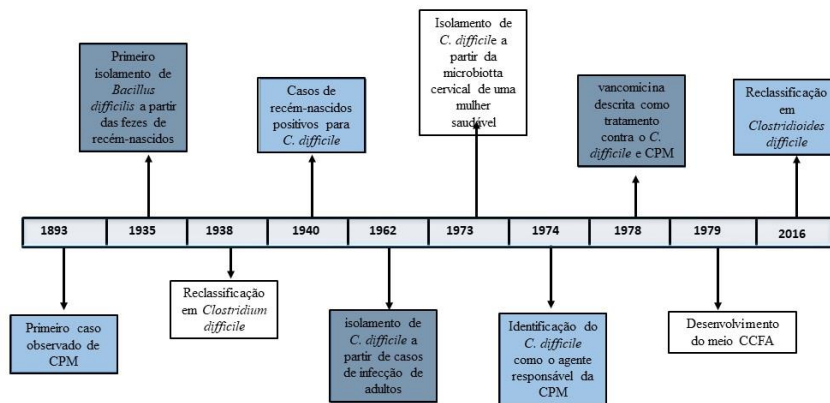
Presume-se que a primeira morte por *C. difficile* tenha ocorrido em 1892. De acordo com os relatos de Finney e Sir William (1893), uma mulher de 22 anos apresentou diarreia e foi a óbito após ser submetida a uma cirurgia para ressecção de um tumor no piloro gástrico. Os laudos da necropsia descreviam uma colite pseudomembranosa (CPM).

Existem relatos de alguns casos de CPM na chamada era “pré-antibiótica”, porém esses relatos se tornaram mais comuns após a introdução dos antibióticos (RODRIGUEZ *et al.*, 2016). Antes do uso de agentes antimicrobianos, não havia correlação desses casos com o *C. difficile*, já que não havia estudos evidenciando sua patogenicidade, e na maioria dos casos a bactéria suspeita era o *Staphylococcus aureus*, por causa da sua relação como um patógeno nosocomial (BARLETTE *et al.*, 2009). No ano de 1974, Tedesco e colaboradores publicaram um importante estudo demonstrando que 40 % dos pacientes submetidos ao tratamento com clindamicina apresentavam diarreia e 10% destes desenvolviam CPM. Um outro achado relevante deste estudo foi que não houve recuperação de *S. aureus* desses pacientes.

Em 1978 foram publicados diversos estudos demonstrando a associação entre *C. difficile* e CPM. O primeiro estudo (GEORGE RH *et al.*, 1978) relatou a presença de toxina nas fezes de pacientes com CPM. Posteriormente, um segundo estudo (GEORGE WL *et al.*, 1978), reportou o isolamento de *C. difficile* a partir das fezes de um paciente com CPM associada ao uso de clindamicina. Um terceiro estudo (LARSON *et al.*, 1978) evidenciou que a CPM resultou da infecção por *C. difficile* (ICD) e que o tratamento prévio com antibiótico resultou em susceptibilidade à infecção. No ano seguinte George *et al.* (1979) conseguiram desenvolver um meio seletivo diferencial para o isolamento de *C. difficile*, conhecido atualmente como Cicloserina-Cefoxitina-Frutose-Ágar (CCFA - do inglês, cycloserine-cefoxitin-fructose Ágar),

o que possibilitou o aumento no número de estudos relacionados a este patógeno. Recentemente, com base em análises fenotípicas, quimiotaxonômicas e filogenéticas, o novo gênero de *Clostridioides* foi proposto por Lawson & Rainey (2016) (LAWSON *et al.*, 2016).

Figura 1. Linha do tempo do histórico do *Clostridioides difficile* em humanos.



Fonte: Adaptado Rodriguez *et al.*, 2016

1.2 *Clostridioides difficile* e suas características

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo composto por uma diversidade de microrganismos, com predominância dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria (RINNINELLA *et al.*, 2019). Essa microbiota tem grande relevância para manutenção da homeostase intestinal do hospedeiro (FILIPPO *et al.*, 2019), pois funciona como uma barreira natural que impede a proliferação de microrganismos patogênicos, além de atuarem na resposta imunológica (BELKAID; HAND, 2014).

Entretanto quando a microbiota intestinal está em desequilíbrio, o aumento de bactérias patogênicas, associadas a um ambiente com alto estresse oxidativo, inflamação e produção de metabolitos pró-inflamatórios pode deixar o hospedeiro susceptível a doenças gastrointestinais (DEGRUTTOLA *et al.*, 2016). Dentre os enteropatógenos responsáveis por causar doenças gastrointestinais, o *C. difficile* merece destaque (LAWSON *et al.*, 2016), por ser responsável pelas principais de infecções nosocomiais relacionada ao uso de antibióticos no mundo, com sintomas que vão desde a diarreia leve á colite pseudomembranosa.

C. difficile é uma bacilo gram-positivo, anaeróbio estrito e produtor de esporos, pertencente à família Clostridiaceae, Classe Clostridia e filo Firmicutes (NEEMAN *et al.*, 2017). As células vegetativas de *C. difficile* possuem de 3–5 µm de comprimento e 0,5 µm de largura. Metabolicamente é considerado um anaeróbio obrigatório, devido a sua incapacidade de usar oxigênio como aceptor final de elétrons, e por ser capaz de crescer somente na presença de baixos níveis de oxigênio (<3% O₂), provavelmente devido a um conjunto de enzimas envolvidas na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (GREGORY; PENSINGER; HRYCKOWIAN, 2021). Além de colonizar seres humanos, o *C. difficile* pode colonizar o intestino de diferentes animais, tais como: aves, porcos, cachorro e diferentes mamífero (KACHRIMANIDOU; TZIKA; FILIOUSSIS, 2019).

No que se refere ao seu crescimento, esta bactéria apresenta uma multiplicação lenta quando comparada a outros anaeróbios. Além disso, seu crescimento pode ser suprimido pela presença de outras bactérias. O isolamento desse microrganismo a partir de amostras fecais é obtido através da utilização de meios seletivos, como o CCFA, que consiste em peptonas de origem animal, frutose e é suplementado com os antibióticos D-cicloserina (500 µg/ml) e cefoxitina (16 µg/ml) que inibem o crescimento maioria das bactérias, mas não de *C. difficile* (ELGENDY *et al.*, 2020).

Uma vez isolado, o *C. difficile* pode ser facilmente subcultivado em meios não seletivos, como Ágar suplementado com sangue de carneiro ou cavalo a 5 %. As colônias de *C. difficile* são facilmente reconhecidas em placas de cultura por apresentarem um aspecto de vidro quebrado (Figura 2). Além disso, suas colônias são planas e irregulares com comprimento variável de 2 a 9 mm de diâmetro, aparência lisa, brilhante e cor branco-acinzentada em meio Ágar infusão de cérebro e coração - BHI (do inglês *Brain Heart Infusion*) (HALL E O'TOOLE, 1935), podendo também apresentar uma fluorescência amarelo-esverdeada, a depender do meio usado, quando observadas sob iluminação ultravioleta (DELMEÉ, 2001). Uma outra característica incomum de *C. difficile* é sua capacidade de produzir o composto bacteriostático para-cresol (p-cresol), como subproduto da fermentação da tirosina, o que confere à cultura destas bactérias um odor característico, frequentemente comparado ao cheiro de estábulo (PASSMORE *et al.*, 2018).

C. difficile existe em duas formas: como célula vegetativa ou endósporo (esporos). Em sua forma vegetativa, metabolicamente ativa, possui o formato de bastonete (Figura 2), podendo ser móvel, devido à presença de flagelos peritríquios. Já os esporos, ovais, subterminais ou terminais (SCHWANBECK *et al.*, 2021), são metabolicamente inativos e formados em resposta à condições ambientais como mecanismo de sobrevivência. De fato, os esporos de *C. difficile*

podem sobreviver em ambientes inóspitos e suportar condições extremas, tais como computadores, luvas, cabeceira de cama, equipamentos médicos portáteis, entre outros, por serem resistentes a condições adversas como altas temperaturas e protocolos de limpeza com álcool 70% ou outros desinfetantes comuns (SJORBERG *et al*, 2013). No entanto, existem alternativas para a desinfecção dos esporos. Lawley *et al*. (2010) demonstraram que os desinfetantes que contêm ingredientes com ativos oxidantes fortes, como o peróxido de hidrogênio, são muito eficazes na inativação de esporos e no bloqueio da transmissão de ICD mediada por estas estruturas.

Figura 2. Microbiologia de *C. difficile* e suas características morfológicas.



Fonte: Acervo pessoal. Imagens de *Clostridioides difficile*. (A) Unidades formadoras de colônias de *C. difficile* em uma placa de Ágar Brucella. (B) Coloração de Gram da cultura de *C. difficile* com células vegetativas (bastões alongados).

1.3 Fisiopatologia da ICD

A principal via de transmissão desse patógeno é a via fecal-oral, e acredita-se que 3 a 5 % dos indivíduos adultos saudáveis estejam colonizados com a espécie. Já em pacientes hospitalizados estas taxas podem ser bem mais elevadas (CASTRO, MUNOZ-PRICE, 2019). Em pacientes hospitalizados, a contaminação pode ocorrer tanto por contato direto com outros pacientes com ICD ou indiretamente do ambiente ou de mãos contaminadas de profissionais da saúde. Outros reservatórios desse patógeno incluem animais de fazenda, animais domésticos e selvagens, alimentos, água, solo, sedimentos, estações de tratamento de águas residuais, usinas de biogás, ar e residências (RODRIGUEZ DIAZ, SEYBOLDT, RUPNIK, 2018).

Considerado um patógeno oportunista, cepas toxigênicas de *C. difficile*, na presença de disbiose intestinal, podem causar doença colônica, sendo a colite pseudomembranosa uma manifestação grave. Os principais fatores de risco para infecção por *C. difficile* incluem terapias com antibióticos, o uso de inibidores de bombas de prótons, hospitalização, idade avançada (≥ 65 anos), tempo prolongado de internação hospitalar, comorbidades como doença renal crônica, doença inflamatória intestinal, imunodeficiência e imunossupressão (FANG *et al.*, 2014). A exposição a diferentes antibióticos, tais como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas, clindamicina e fluoroquinolonas aumentam consideravelmente o risco à infecção (PENG *et al.*, 2019).

A administração de antibióticos provoca mudanças na microbiota, o que permite a germinação dos esporos de *C. difficile*. No intestino delgado, os esporos germinam na forma vegetativa e se multiplicam. Flagelos e fímbrias permitem a adesão e penetração de células vegetativas de *C. difficile* à camada de muco que envolve os enterócitos (Figura 3). Subsequentemente, a próxima etapa do processo patogênico é a produção de toxinas. Existem cepas de *C. difficile* toxigênicas ou não toxigênicas. As cepas toxigênicas produzem toxinas, as quais são responsáveis por ocasionar ICD (ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2013). As duas grandes toxinas do *C. difficile* toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB) são os fatores de virulência mais bem caracterizados (BELLA *et al.*, 2016).

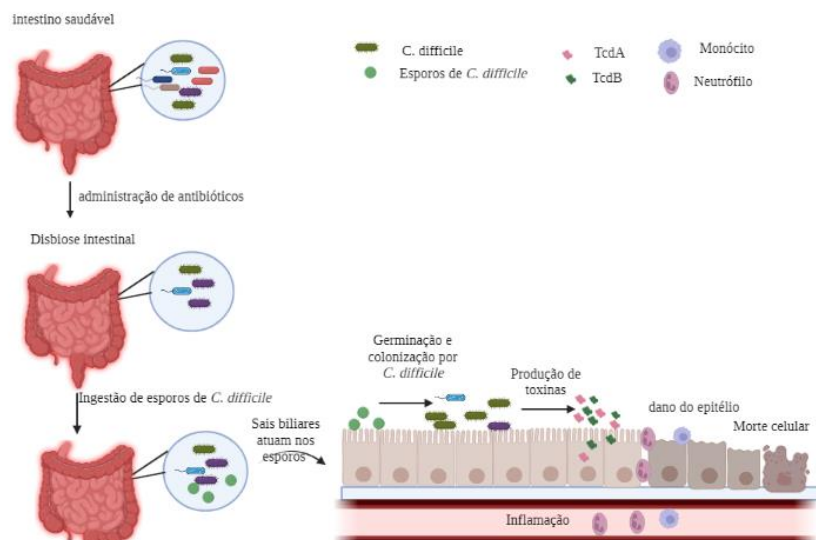
Tanto a TcdA quanto a TcdB entram na célula por endocitose e induzem apoptose. A TcdB é 1000 vezes mais potente em seu efeito citotóxico do que a TcdA (FARROW *et al.*, 2013). Ambas as toxinas estimulam monócitos e macrófagos, as células epiteliais por sua vez liberam interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 (IL-1) e outras citocinas, resultando em infiltração tecidual com neutrófilos e intensa reação inflamatória (Figura 3). Especificamente a TcdA compromete a adesão das células epiteliais da mucosa do cólon à membrana basal subjacente, levando à destruição da mucosa. Em um artigo do nosso grupo de pesquisa, Brito *et al.* (2002a), demonstrou que a TcdA do *C. difficile* causa glicosilação de Rho em leucócitos polimorfonucleares (PMNL) humanos, o que resulta em alterações morfológicas e funcionais destas células. Estudos *in vitro* demonstram que PMNL incubados com TcdA apresentam alteração do seu formato esférico para uma forma fina, semelhante a uma corda. Essas mudanças foram acompanhadas de um rearranjo do citoesqueleto de actina, bem como de uma maior aderência de PMNL a um substrato de matriz extracelular.

A TcdA aumenta a aderência de PMNL a uma superfície revestida de fibrinogênio, e tal fato pode ser um fator contribuinte para a formação de placas pseudomembranosas típicas da colite pseudomembranosa por *C. difficile*. Em um outro artigo, publicado no mesmo ano,

Brito *et al.* (2002b) mostrou que, células epiteliais intestinais do cólon humano (T-84), tratadas com TcdA, sofriam apoptose, entretanto, o processo de apoptose era completamente inibido pelo bloqueio da atividade enzimática da toxina na Rho GTPases com uridina-5-difosfato-2,3-dialdeído e parcialmente inibida quando se utilizava inibidores de caspases 1, 3, 6, 8 e 9. Esses achados levaram os autores a concluir que a TcdA induzia a apoptose pelo mecanismo dependente da inativação de Rho e da ativação de caspases 3, 6, 8 e 9, além da ativação de Bid, e dano mitocondrial seguido da liberação de citocromo c.

De forma geral, a produção e liberação destas toxinas podem causar múltiplos efeitos, tais como desorganização do citoesqueleto de actina e das junções de oclusão, além do acúmulo de fluidos e apoptose de células epiteliais intestinais (DAPA *et al.*, 2013). Algumas cepas de *C. difficile* produzem ainda uma terceira toxina, conhecida como *C. difficile* transferase (CDT). Essa toxina é comumente encontrada em cepas hipervirulentas, como em cepas do ribotipo 027 e 078, fato esse que levanta a questão de sua função celular e papel patogênico (AKTORIES *et al.*, 2018; RAMYAVARDHANEE *et al.*, 2017). Embora o papel da CDT na infecção por *C. difficile* ainda não seja compreendido, sabe-se que ela pode atuar sinergicamente com as toxinas TcdA e TcdB. A CDT é estrutural e funcionalmente diferente das TcdA e TcdB e seu mecanismo de ação consiste em atuar diretamente na proteína actina, alterando o citoesqueleto (STIEGLITZ *et al.*, 2021).

Figura 3. Figura esquemática da patogênese do *Clostridioides difficile*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Após alterações na microbiota intestinal normal os esporos de *C. difficile* germinam por meio da ação dos sais biliares. Subsequentemente, *C. difficile* coloniza o intestino e começa a secretar as

toxinas, a produção e liberação destas toxinas causam diversos efeitos, tais como desorganização do citoesqueleto de actina e das junções de oclusão, danos nas células epiteliais, além da morte celular.

1.4 Epidemiologia do *Clostridioides difficile*

Inicialmente *C. difficile* foi considerado um patógeno nosocomial e os casos de infecções eram raros, até a década de 1990. No entanto, a epidemiologia do ICD mudou nas últimas duas décadas, sendo observado um aumento da incidência de ICD em várias regiões, tais como países da América do Norte, Europa, Austrália, Ásia e América Central (EZE *et al.*, 2017; COLLINS; HAWKEY; RILEY, 2013). Mudanças na epidemiologia do ICD ocorreram devido ao aumento do uso agentes antimicrobianos (FREEMAN *et al.*, 2010). Um estudo de Clifford McDonald *et al.* (2005) em 187 isolados de *C. difficile* de diferentes localidades dos EUA, revelou que uma cepa específica estava mais intimamente associada ao aumento da incidência, e apresentação clínica alterada da infecção por *C. difficile*, esta cepa epidêmica, foi categorizada como toxinotipo III, pertencente ao grupo BI com base na análise de fragmentos de restrição (REA), pulsotipo NAP1 (North America Pulsetype 1), de acordo com perfil obtido na eletroforese de campo pulsado, além disso, foi identificada como ribotipo RT027, quando utilizada a técnica de ribotipagem (WARNY *et al.*, 2005). Além da produção das toxinas A e B, estas cepas codificam a terceira toxina, conhecida como transferase de *C. difficile* (CDT) ou toxina binária, e apresentam uma produção mais significativa de toxinas *in vitro* (MACCANNELL *et al.*, 2006).

Outras particularidades da cepa NAP1/027/BI incluem alta taxa de transmissibilidade, produção elevada de esporos e resistência a antibióticos da classe das fluoroquinolonas (GOUDARZI *et al.*, 2014; O'CONNOR *et al.*, 2009). Após seu isolamento e identificação na América do Norte, esta cepa foi identificada na Europa, Canadá, América Central, América do Sul, com distribuições variáveis entre os diferentes países (VARDAKAS *et al.*, 2012; AGUAYO *et al.*, 2015). Na Europa, o RT027 foi identificado em oito países e consiste em 30% dos isolados, os primeiros surtos relacionados a essa cepa ocorreram entre 2005-2007, no Reino Unido, Holanda, Bélgica e França (MARUJO; ARVAND, 2020).

Assim como a NAP1/027/BI, outros genótipos hipervirulentos emergentes podem apresentar uma ameaça equivalente em termos de gravidade da doença, como por exemplo cepas pertencentes ao ribotipo 078. O RT078, assim como, o RT027 também produz TcdA, TcdB e toxina binária CDT (A⁺B⁺CDT⁺) e causam doença de gravidade semelhante. Sua importância como patógeno humano foi relatada pela primeira vez na Holanda, onde as taxas de infecção causadas por essa cepa aumentaram quase 10 % entre 2005 e 2008 (GOORHUIS

et al., 2008), coincidindo, com um aumento semelhante de surtos ocasionais em toda a Europa (NOTERMANS *et al.*, 2011).

Na Ásia, as cepas pertencentes ao RT017, que inclui cepas A⁻B⁺CDT⁻, são as mais comuns em circulação. Esse ribotipo ganhou destaque a partir dos anos 2000, após uma série de surtos, em países como Japão (COLLINS; HAWKEY; RILEY, 2013; KATO *et al.*, 2001), Coreia (KATO *et al.*, 2010), Taiwan (LIN *et al.*, 2015) e China (JIN *et al.*, 2017). *C. difficile* RT017 é classificado como toxinotipo VIII e pulsotipo NAP 9. Devido a uma deleção na região repetitiva do gene *tcdA*, estas cepas produzem apenas a TcdB, e embora, não produzam uma TcdA funcional, as cepas de *C. difficile* RT 017 demonstraram igual capacidade de causar doenças graves (IMWATTANA *et al.*, 2019).

No que se refere a América Latina, o *C. difficile* vem sendo estudado em países como o Chile, Uruguai, Costa Rica, Argentina, Mexico e Brasil, contudo, dados epidemiológicos e os perfis toxigênicos, das cepas circulantes nesses locais, permanecem escassos (Costa *et al.*, 2017; Girão *et al.*, 2021). Quesada *et al.*, 2010 relatou o primeiro caso de CDI causado pelo RT027, em pacientes internados em um hospital da Costa Rica. A cepa isolada pelos pesquisadores foi denominada de LIBA 5756. Posteriormente o RT027 foi detectado em outros países da América Latina, tais como, Chile (HERNANDEZ-ROCHA *al.*, 2012), Panamá (AGUAYO *al.*, 2015) e México (TAMEZ-TORRES *et al.*, 2017).

No Brasil, até o presente momento, não existem relatos da presença de cepas NAP1/RT027, contudo outros ribotipos foram identificados em diferentes regiões do país, entre estes os RT: 014, 043, 046, 106, 132, 133, 134, 135, 136, 142, 143 e 233 (TRINDADE *et al.*, 2019). No Ceará, especificamente, Costa *et al.* (2016) identificou uma cepa com características hipervirulentas, recuperada de uma paciente com diagnóstico para câncer de mama, que morreu de diarreia grave. A cepa em questão, denominada inicialmente de ICC-45, é toxigênica (*tcdA*⁺, *tcdB*⁺ e *ctdB*⁺), e classificada como toxinótipo IXb. Uma abordagem polifásica atribuiu um novo ribotipo para esta cepa (SLO231/UK[CE]821). Além disso, a análise de tipagem molecular (MLTS), identificou a cepa ICC-45 como pertencente ao ST41 do Clado 2 (Figura 4), o mesmo Clado a qual pertence as cepas hipervirulentas NAP1/027. No entanto, diferentemente das cepas epidêmicas NAP1/027, que também são classificadas no MLST Clado 2, a cepa ICC-45 é suscetível às fluoroquinolonas e não produz em excesso as toxinas TcdA e TcdB. Estudos *in vivo*, em modelo de alça ileal em camundongos, demonstraram que as cepas ICC-45 e NAP1/BI/027 (LIBA 5756), apresentam uma patogênese semelhante. Foi observado que ambas as cepas produziam uma expressão de citocinas pró-inflamatórias, alta produção de enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), danos epiteliais e resposta ao estresse oxidativo

equivalente (COSTA *et al.*, 2016).

Figura 4 Árvore filogenética baseada no genoma do núcleo da cepa *C. difficile* (ICC-45)



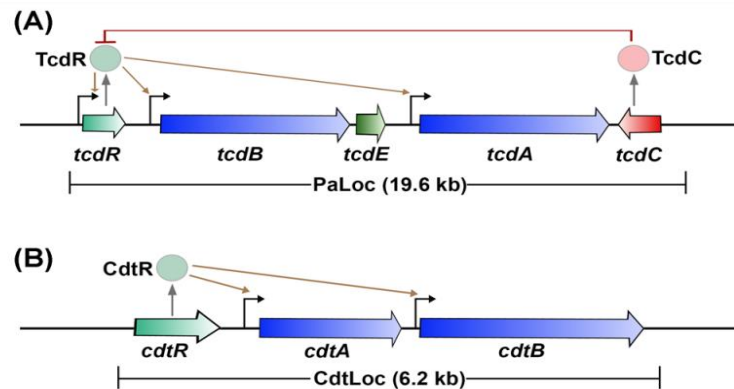
Fonte: Costa *et al.*, 2016

1.5 Fatores de Virulência de *C. difficile*

1.5.1 Toxinas

Como mencionado anteriormente, os principais fatores de virulência do *C. difficile* são as enterotoxinas TcdA e TcdB, codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*, ambos localizados em um *locus* de patogenicidade de 19.6kb, denominado de PaLoc (Figura 5A), juntamente com outros três genes *tcdR*, *tcdE* e *tcdC* (AWAD *et al.*, 2014). O *tcdR*, é o gene responsável por codificar um fator sigma alternativo, que funciona como um promotor dos genes *tcdA* e *tcdB* (RANSOM *et al.*, 2018). O *tcdC* codifica um fator anti-sigma que interage diretamente com *tcdR* regulando-o negativamente (BAKKER *et al.*, 2012) e *tcdE*, que codifica uma proteína do tipo holina importante para a liberação das toxina da célula (GOVIND; DUPUY *et al.*, 2012). TcdA, uma molécula com massa molécula de 308 kDa, e TcdB (~270 kDa) pertencem à família de grandes toxinas clostridiais (LCTs), a qual inclui outros membros, tais como *Paeniclostridium sordellii*, um patógeno que produz as toxinas letal (TcsL) e hemorrágica (TcsH) que em humanos causa edema, gangrena e mionecrose, muitas vezes seguido por síndrome de choque tóxico fatal (PRUITT *et al.*, 2012). A expressão de *tcdA* e *tcdB*, é regulada por vários fatores, tais como: condições ambientais, disponibilidade de nutrientes particulares, alterações na temperatura e potencial redox, estas proteínas são expressas, por exemplo, quando as células entram na fase estacionária, o que ocorre provavelmente pela limitação de nutrientes (DI BELLA *et al.*, 2016; AKTORIES *et al.*, 2017).

Figura 5. Locus de patogenicidade (PaLoc) das toxinas produzidas por *C. difficile*.



Fonte: Chandrasekaran *et al.*, 2017. Organização de genes de toxinas. (A) Representação esquemática do locus de patogenicidade (PaLoc) (B) Representação esquemática do locus da toxina binária (CdtLoc).

O modo comum de ação de TcdA e TcdB é desencadeado por glicosilação específica de proteínas Rho-GTPase no citosol do hospedeiro usando UDP-glicose como co-substrato, resultando na inativação de proteínas Rho (CHEN *et al.*, 2022). As proteínas Rho são os membros-chave em muitos processos biológicos, e controlam, uma ampla variedade de vias de sinalização. As Rho são reconhecidas, principalmente por seu papel fundamental na regulação do citoesqueleto de actina, além disso, estas proteínas podem influenciar na dinâmica dos microtúbulos, nas vias de transporte da membrana e na atividade de fatores de transcrição. A inibição da sinalização dessas moléculas leva a disruptura do citoesqueleto, injúria do epitélio intestinal e apoptose por ativação de caspases (HODGE; RIDLEY, 2016; PHUYAL; FARHAN, 2019).

Como mencionado anteriormente, além de TcdA e TcdB, 6-30% das cepas de *C. difficile* produzem uma outra toxina, a CDT. Esta toxina é muito parecida com as da difteria, cólera e coqueluche. Os genes que codificam CDT estão localizados no locus Cdt de 6,2 kb (CdtLoc) que é composto por dois genes, o *cdtA*, uma ADP-ribosil transferase específica de actina, e o *cdtB*, o componente de ligação ao receptor, bem como pelo gene regulador *cdtR* (Figura 5B). O papel desta toxina na ICD, não é completamente claro, uma vez que muitas cepas patogênicas não possuem o gene para codificá-la. Contudo, acredita-se que CDT aumenta a atividade de TcdA e TcdB. Yuong *et al.*, 2022 relataram que pacientes com CDI, que apresentavam cepas com expressão positiva da CDT, tinham maior uma gravidade da doença e pior desfecho clínico (YOUNG *et al.*, 2022). Cowardin *et al.*, 2016 mostraram que o CDT aumenta a virulência de duas cepas de PCR-ribotipo 027 em camundongos, por meio de uma via dependente do receptor

Toll-like 2 (TLR2). Adicionalmente, estudos *in vitro*, demonstram que a toxina binária medeia o aumento da aderência de *C. difficile* as células epiteliais (SCHWAN *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* em camundongos, demonstram que quando estes animais eram infectados por uma cepa produtora de CDT, a adesão bacteriana nas células epiteliais do intestino era 4 vezes maior, indicando um papel para a toxina binária na adesão e colonização (COWARDIN *et al.*, 2016). CDT causa ADP-ribosilação e despolimeriza a actina e causa a formação de protusões de microtúbulos nas células, estas protusões formam uma malha densa nas superfícies da célula, aumentando a adesão bacteriana (GERDING *et al.*, 2009).

1.5.2 Endosporos

Os esporos de *C. difficile* são a principal via de transmissão de ICD. Seus esporos possuem uma estrutura complexa (Figura 6) que o permite a aderir superfícies e resistir a ambientes adversos, por exemplo: calor extremo, alterações de pH e estresse químico, além de serem resistentes a forças mecânicas e condições aeróbicas (EDWARDS *et al.*, 2016). Embora não se conheça os fatores moleculares exatos que desencadeiam a esporulação de *C. difficile*, acredita-se que estímulos ambientais como limitação de nutrientes, *quorum sensing* e outros fatores de estresse estejam envolvidos nesse processo (ZHU; SORG; SUN, 2018).

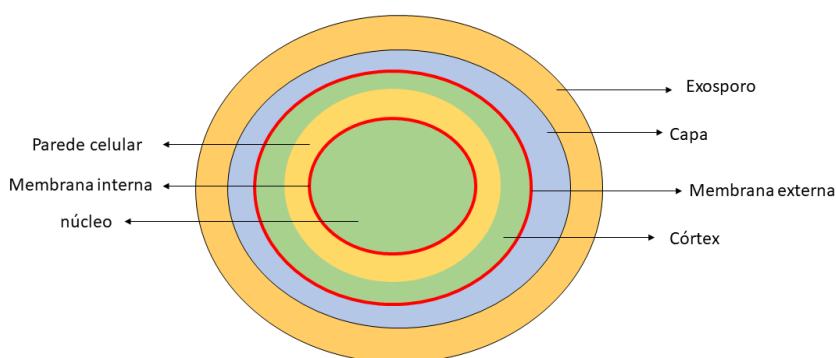
No que se refere a estrutura, a arquitetura dos esporos é conservada entre as bactérias formadoras de endósporos. No centro, localiza-se o núcleo, o qual contém DNA genômico, mRNA, ribossomos, proteínas e é muito rico em ácido piridina-2,6-dicarboxílico (DPA) quelado com o cátion divalente Ca^{2+} , formando Ca-DPA, o qual contribui para a diminuição da quantidade de água do núcleo (JAMROSKOVIC *et al.*, 2016). Envolvendo o núcleo, observa-se uma membrana interna, que atua como uma barreira de permeabilidade e contribui para a resistência do esporo, impedindo a entrada de compostos que danificam o DNA (LAWLER; LAMBERT; WORTHINGTON, 2020).

Após a membrana interna observa-se a parede celular germinativa, contendo peptideoglicano e que se torna a parede celular após a germinação. A seguir, encontra-se um córtex especializado que também contém peptideoglicano reticulados modificados que são seletivamente hidrolisados por enzimas líticas do córtex durante a germinação (PAREDES-SABJA; SHEN; SORG, 2014). O córtex é envolvido por uma membrana externa e camadas de proteína de revestimento. As proteínas do revestimento do esporo protegem contra o ataque de enzimas e produtos químicos. Em algumas cepas de *C. difficile*, há ainda uma camada de

exosporium envolvendo o revestimento, que parece contribuir para as interações iniciais com o hospedeiro (ROMERO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Quando os esporos são ingeridos por um hospedeiro, inicia-se o processo de formação de células vegetativas (germinação), que podem colonizar um hospedeiro suscetível. Quando não se encontram as condições favoráveis, os esporos não germinam (ZHU; SORG; SUN, 2018). O processo de germinação pode ser iniciado por diferentes vias, desencadeadas por fatores específicos (glicina, taurocolato, Ca²⁺), que se encontram no trato gastrointestinal do hospedeiro (KOCHAN *et al.*, 2018). As células vegetativas proliferam continuamente, até quando as condições ambientais permitam. Quando param de proliferar, entram no processo de esporulação se forem expostas ao oxigênio ou encontrarem falta de nutrientes (FIMLAID *et al.*, 2015). No *C. difficile*, o começo da esporulação é iniciada pela proteína A de esporulação de estágio 0 (Spo0A), que é ativada por fosforilação. Spo0A é um fator de transcrição crítico para o ciclo de vida do *C. difficile*, que regula vários outros processos celulares, incluindo a formação de biofilme. A concentração de Spo0A fosforilada, presente dentro da célula bacteriana é usada para definir o processo celular que será ativado, por exemplo, níveis mais altos de Spo0A fosforilado induzem a esporulação e reprimem outras funções celulares vegetativas (WANG *et al.*, 2021; DICANDIA *et al.*, 2022). Devido a esse ciclo de vida do *C. difficile* e sua capacidade de formar esporos resistentes, a ICD é difícil de ser tratada eficazmente, pois estas estruturas podem sobreviver no cólon mesmo após os tratamentos com ICD com o uso de antimicrobiano anti-*C.difficile*. Além disso, resistência dos esporos em ambientes secos propicia disseminação da infecção, principalmente para pacientes com disbiose.

Figura 6. Desenho esquemático da estrutura do esporo de *C. difficile*



Fonte: Adaptado de Zhu *et al.*, (2018).

1.5.4 Adesinas

Um outro importante fator de virulência do *C. difficile* são as adesinas. Após, a ingestão de esporos, o primeiro passo para a colonização dos tecidos é a aderência às células hospedeiras, esta etapa envolve a interação da bactéria com o epitélio da mucosa, com concomitante evasão do sistema imunológico do hospedeiro (ARATO *et al.*, 2018). O primeiro estudo a demonstrar sinais da aderência do *C. difficile* ao intestino humano foi publicado por Borriello e outros autores em 1979. Neste estudo os autores detectaram a presença de células de *C. difficile*, em uma amostra de biópsia lavada, de um paciente com CPM. Em um outro estudo, utilizando hamster como modelo animal, estes mesmos autores constataram que cepas toxigênicas aderiam mais fortemente ao epitélio da mucosa do que cepas não toxigênicas (BORRIELLO *et al.*, 1998).

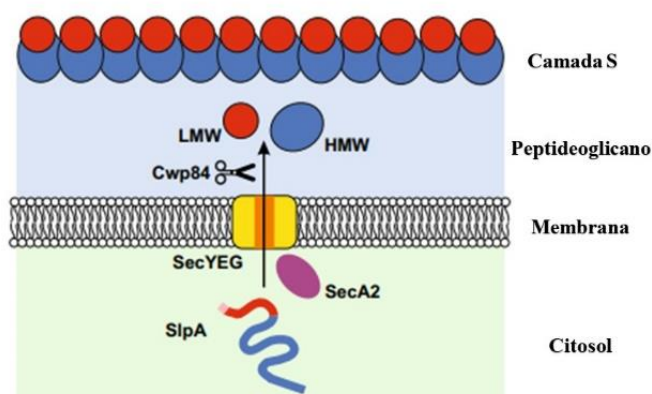
Outros estudos em culturas de células, demonstram a capacidade do *C. difficile* em aderir a diversas linhagens celulares, tais como, células Vero, células Hela, células Hep-2, células Caco-2 semelhantes a enterócitos e HT-29 (NAABER *et al.*, 1996; DRUDY *et al.*, 2001). A adesão e colonização do *C. difficile* no trato gastrointestinal é mediada por diversos fatores de adesão, como, proteínas da camada S (SLPs) e proteínas da parede celular (CWPs) (PÉCHINÉ; DENÈVE-LARRAZET; COLLIGNON, 2016). Outras proteínas de superfície provavelmente envolvidas na colonização do hospedeiro, são a proteínas de choque térmico GroEL, as proteínas flagelares FliC e FliD1.

As CWPs do *C. difficile* são uma família de 29 parálogos, da qual fazem parte a grande maioria das proteínas da parede celular do *C. difficile*, dentro desta família incluem-se uma variedade de proteínas, como as SLPs (FAGAN; FAIRWEATHER, 2014), Cwp 84 (JANOIR *et al.*, 2007), Cwp12, Cwp16, Cwp19, Cwp22 (BRAUER *et al.*, 2021), e a proteína de fase variável CwpV (SEKULOVIC *et al.*, 2015). As SLPs são subunidades semipermeáveis que compõem as camadas de superfície bacteriana (S-), e atuam como uma camada externa protetora, que é essencial para a virulência. Os principais componentes estruturais da camada S resultam da clivagem proteolítica de uma proteína precursora a SlpA (Figura 7). No *C. difficile*, esta é a proteína de superfície mais abundante, e é formada por duas subunidades, as proteínas de baixo peso molecular, 47 kD (LMW SLP) e alto peso molecular, 80 kD (HMW SLP). A SlpA é produzida como uma pré-proteína (Figura 6), e é secretada e processada pela cisteína protease da superfície celular Cwp84. A Cwp84 cliva e processa SlpA, que desempenha um importante papel na montagem da camada S. Um estudo demonstrou que cepas mutantes sem Cwp84 apresentam SlpA de comprimento total na superfície da célula, o que implica na

produção de uma camada S anormal, com conseqüente alteração da morfologia da colônia (KIRBY *et al.*, 2009).

Estudos de Merrigan *et al.* (2013) demonstram que SlpA é um dos principais contribuintes para a adesão do *C. difficile* a célula hospedeira, pois foi observado que o pré-tratamento de células hospedeiras com SlpA purificada anulava a fixação de *C. difficile* de maneira dose-dependente. Adicionalmente, o pré-tratamento de *C. difficile* com anticorpos anti-SlpA também anulava a adesão.

Figura 7. Maturação do complexo proteico da camada S de *Clostridioides difficile*.



Fonte: Adaptado de Oatley *et al.*, (2020). A protease Cwp 84 cliva SlpA em duas subunidades, as proteínas de baixo peso molecular (LMW, representado por esferas vermelhas) e de alto peso molecular (HMW, representado por esferas azuis). As SLPs HMW e LMW se reúnem para formar heterodímeros que se incorporam à camada S.

1.6 Biofilmes

Um outro fator envolvido na virulência da ICD é a formação de biofilmes. Biofilmes são uma complexa comunidade microbiana, constituída por uma ou mais espécies de microrganismos, onde estes, são revestidos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) autoproduzida, e podem estar aderidos a uma superfície, biótica ou abiótica (GUPTA *et al.*, 2016; VESTBY *et al.*, 2020). A matriz é constituída principalmente de polissacarídeos, proteínas, e ácidos nucleicos, além disso, pode conter materiais não celulares, como partículas minerais (MOTTA *et al.*, 2021).

A primeira observação de um biofilme foi feita por Antoni van Leeuwenhoek, em 1683, que ao examinar seu próprio dente com um microscópio primitivo, fez a seguinte observação sobre a placa dentária: ``são tantos que acredito que excedem o número de homens em um

reino'' (Apud VESTBY *et al.*, 2020). Apesar dessa descoberta, a formação desses microrganismos como agregados, não era de interesse dos microbiologistas médicos até o início da década de 1970, quando Nils Hoiby notou uma forte ligação, entre a etiologia de uma infecção persistente e aglomerados de bactérias em pacientes com fibrose cística. A partir de então, começou-se a olhar com mais atenção a relação dos biofilmes com as infecções clínicas (Apud HØIBY *et al.*, 2017). Em 1985, Costerton demonstrou que bactérias em crescimento de biofilme apresentavam um aumento da resistência antimicrobiana, em comparação com bactérias de crescimento planctônico. Além disso, Costerton dedicou-se ainda, a dar palestras sobre biofilmes e infecções, abrindo o caminho para a compreensão geral na medicina do conceito de infecção por biofilme, sobretudo no que diz respeito a infecções crônicas.

Biofilmes funcionam como uma barreira de difusão química, protegendo os microrganismos da ação direta dos antibióticos, o que torna as infecções mais difíceis de serem tratadas. Os biofilmes são associados a 65-80 % das infecções nosocomiais de acordo os Institutos Nacionais de Saúde (NIH), (CROWTHER, WILCOX E CHILTON, 2016; SEMENYUK *et al.*, 2014; MATHUR *et al.*, 2016) e estão associados à maior recorrência do *C. difficile* (DAWSON *et al.*, 2012), com impacto econômico importante. A formação de biofilmes tem sido associada a infecções persistentes em vários tecidos e a dispositivos artificiais utilizados amplamente utilizados, tais quais cateteres, stents, implantes ortopédicos, lentes de contato e dispositivos eletrônicos implantáveis.

Biofilmes são a forma predominante da bactéria na natureza. Essa formação favorece as interações entre os membros da comunidade, bem como a captura de recursos, sendo utilizado, portanto, como uma estratégia de sobrevivência (BERLANGA E GUERRERO., 2016). Além do mais, para muitos microrganismos, sua formação protege a comunidade microbiana de outros estressores ambientais, como, radiação ultravioleta (UV), temperatura alta, pH extremo, salinidade e alta pressão (YIN *et al.*, 2019).

1.6.1 Formação e desenvolvimento de biofilmes

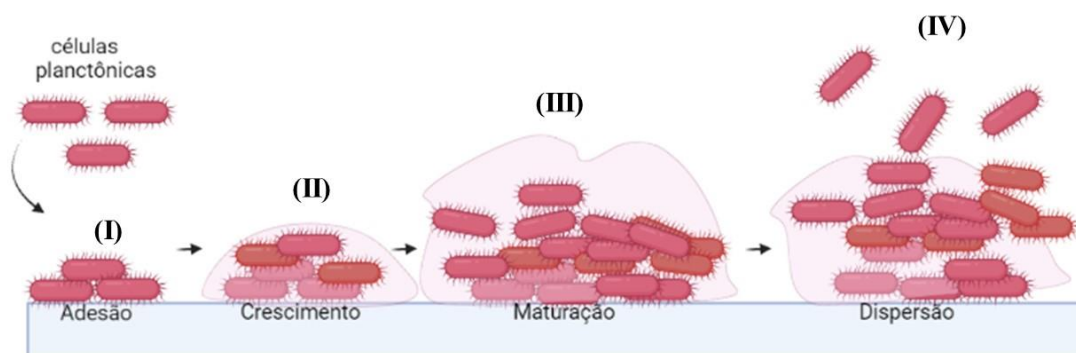
O processo de formação de biofilmes é complexo, e regulado por diversos fatores, incluindo motilidade, adesão e hidrofobicidade das células bacterianas (DAPA e UNNIKISHNAN, 2013; TAGGART *et al.*, 2021). Esquemáticamente, a formação de biofilmes pode ser dividida em quatro etapas, conforme ilustrada na Figura 8: o passo inicial é a fixação (reversível) de células planctônicas a uma superfície, criando microcolônias (I). A comunicação dentro destas microcolônias é realizada por meio do *quorum sensing* (QS), que

confere às bactérias, a capacidade de reconhecer a densidade populacional. Adicionalmente, esse sistema permite que células bacterianas coordenem o comportamento e respondam aos fatores ambientais como uma comunidade (PENA *et al.*, 2019). Subsequente a fixação, a microcolônia começa a sua expansão, com recrutamento de células planctônicas adicionais e divisões celulares, enquanto as bactérias começam a produzir substâncias extracelulares poliméricas (EPS) e/ou outros meios de ancoragem e adesinas específicas, responsáveis por conduzir a ligação transicional reversível para irreversível (II). As EPS são constituintes fundamentais dos biofilmes, pois auxiliam na captação de água e nutrientes para a comunidade, quando estes recursos são limitados (FLEMMING *et al.*, 2016).

Durante os próximos passos, ocorre a agregação e maturação do biofilme (III). Nesta etapa os microrganismos envoltos pelas EPS começam a se replicar ativamente aumentando a densidade e a complexidade do biofilme. A arquitetura do biofilme amadurece como resultado das interações entre as colônias microbianas e as substâncias extracelulares (DAVIES *et al.*, 1995). Observa-se uma grande diferença na expressão gênica e na síntese de proteínas de biofilmes maduros em relação ao crescimento (RUMBAUGH; SAUER, 2020). Ademais, essa formação tardia de biofilme, faz com estas estruturas se tornem reservatórios de esporos, quais são produzidos em resposta à falta de nutrientes. Biofilmes maduros são ainda, altamente resistentes à ação dos sistemas de defesa imune inata e adaptativa (DAPA *et al.*, 2013).

A etapa final no desenvolvimento do biofilme é a dispersão (IV). Acredita-se que seja o principal mecanismo que limita o acúmulo de biomassa do biofilme. Neste passo, ocorre o desprendimento das células do biofilme e dispersão no ambiente circundante, possibilitando que as bactérias colonizem novas superfícies. Mecanismos distintos de dispersão têm sido reconhecidos, são eles: erosão, descolamento e abrasão. A abrasão refere-se a perda do biofilme causada por colisões com partículas do ambiente. Já a erosão e deslocamento, referem-se à perda de pequenas porções de células e de pedaços intactos do biofilme, respectivamente, sendo esta perda ocasionada pelas forças de fricção dos fluidos (RUMBAUGH; SAUER, 2020). Embora ainda pouco compreendido, todos esses processos são estritamente regulados por diferentes moléculas de sinalização celular.

Figura 8. Etapas da formação do biofilme.



Fonte: Adaptado de Taggart *et al.*, 2021.

1.6.2 Biofilmes e *C. difficile*

Vários estudos demonstraram a capacidade do *C. difficile* de formar biofilmes de espécies únicas (DAWSON *et al.*, 2012, DAPA *et al.*, 2013; CROWTHER *et al.*, 2014; SEMENYUK *et al.*, 2014). O primeiro relato da formação de biofilme por *C. difficile* foi feito por Donelli e colaboradores (2012), onde foi identificado o papel de biofilmes polimicrobianos no entupimento de stents biliares. Dawson *et al.*, 2012 também demonstrou *in vitro* que o *C. difficile* se agrega para formar biofilmes em superfícies abióticas. Outros estudos corroboraram com Dawson (DAPA *et al.*, 2013; PANTALÉON *et al.*, 2015), onde estes pesquisadores revelaram que a quantidade de biofilme produzido era dependente da cepa, com cepas hiper virulentas formando um biofilme maior (DAPA *et al.*, 2013; PIOTROWSKI *et al.*, 2019).

Embora ainda não exista evidências concretas da formação de biofilme de *C. difficile* no TGI humano, Semenyuk e colaboradores (2015) confirmaram que *C. difficile* fazia parte minoritariamente de uma comunidade multiespécies, localizada na camada externa de muco no ceco e cólon de camundongo. Soavelomandroso e outros autores (2017) demonstraram que a cepa R20291 é capaz de formar estruturas multicelulares, como agregados microbianos no intestino. Estas estruturas, semelhantes a biofilme, estavam presentes como pequenas ilhotas irregularmente distribuídas sobre a mucosa, nos tecidos intestinais de camundongos. Ainda, existem muitas lacunas em nosso conhecimento acerca da estrutura e funcionamentos, destas

comunidades microbianas. A compreensão das características e fatores regulatórios dos biofilmes é essencial para controlar o crescimento bacteriano.

Vários fatores modulam a formação de biofilme no *C. difficile*, incluindo pili, flagelos, a camada S, Cwp84, *quorum sensing* e esporulação (Quadro 1) (DAPA e UNNIKRIISHNAN, 2013, TAGGART *et al.*, 2021). O regulador mestre da esporulação, Spo0A, pode desempenhar um papel fundamental na formação de biofilme, já que a inativação genética de *spo0A* culmina com diminuição da formação de biofilme (DAWSON *et al.*, 2012; DAPA *et al.*, 2013). O Regulador do *quorum sensing* (*luxS*) e os flagelos (*fliC*) também estão envolvidos na formação de biofilmes. Ao verificar o papel de uma cepa mutante para o gene da flagelina, *fliC*, Dapa *et al.* (2013) demonstram uma diminuição significativa no acúmulo de biofilme para o *fliC* mutante em comparação com o tipo selvagem, no quinto dia de cultivo, usando coloração por CV. O gene *fliC* codifica a proteína do filamento flagelar e os componentes estruturais dos flagelos são importantes para adesão e colonização. Os flagelos são essenciais para a formação do biofilme, proporcionando o movimento que leva ao contato da célula bacteriana com a superfície, aderindo fisicamente à superfície e sinalizando a adesão bacteriana. Buckley *et al.* (2011) observou por meio de microscopia eletrônica de transmissão que o *C. difficile* parecia interagir com células epiteliais intestinais e outras bactérias, através de apêndices semelhantes a flagelos em modelo *in vivo* de ICD. A análise do regulador de quórum sensing (*luxS*), também revelou uma diminuição drástica na formação de biofilme em cepas mutante para o *luxS*, o que foi constatado tanto por coloração com cristal violeta, quanto por microscopia confocal. Adicionalmente, este experimento demonstrou que o mutante para *luxS* é incapaz até mesmo de formar uma monocamada bacteriana na superfície do vidro.

Dapa *et al.* (2013) também encontraram um papel para uma camada S madura na formação inicial de biofilme de *C. difficile* ao investigar um gene *cwp84* mutado. O mutante de deleção *cwp84* não apresentou defeito no crescimento planctônico na cepa R20291; no entanto, foi observada uma redução dramática no acúmulo de biofilme (DAPA; UNNIKRIISHNAN, 2013). O oposto foi observado na cepa 630, pois esse mutante apresentou um aumento na formação de biofilmes (PANTALEON *et al.*, 2014). Mutantes deficientes em proteínas relacionadas ao estresse, incluindo o regulador de resposta SOS, LexA, a chaperona de RNA, Hfq, e a chaperona associada ao estresse térmico, DnaK, têm sido associados ao aumento da formação de biofilme.

Um outro gene envolvido na regulação do biofilme é o *dccA*, um gene responsável por codificar a diguanilato ciclase, enzima responsável pela síntese do segundo mensageiro diguanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP). A sinalização de c-di-GMP parece ser relevante

na adaptação de *C. difficile* ao seu ambiente, já que quase 1% do genoma histórico de *C. difficile* 630 (ribotipo 012) é dedicado ao metabolismo de c-di-GMP. Observou-se que o *dccA*, promove a regulação da formação de biofilme. De fato, em um estudo usando a cepa 630 mutante, a superexpressão do gene *dccA*, levou à cepa a formar biofilmes mais maduros em comparação com o controle (POQUET *et al.*, 2018).

A proteína DnaK, foi encontrada na matriz do biofilme de *C. difficile* e parece estar envolvida em sua regulação, esta chaperona ajuda no enovelamento de proteínas e é regulada positivamente sob condições de estresse térmico. Uma mutação de inserção ClosTron no gene *dnaK* de uma cepa 630 Δ erm, resultou em um aumento significativo na formação de biofilme, bem como aproximadamente 50% de alongamento das células em bastonetes filamentosos (JAIN *et al.*, 2017).

Quadro 1. Principais genes envolvidos na regulação de biofilme do *C. difficile*

Gene	Achado	Referências
<i>spo0A</i>	Cepas R20291 de <i>C. difficile</i> com inativação do gene <i>spo0A</i> demonstraram diminuição significativa na formação de biofilme.	DAWSON <i>et al.</i> , 2012 ; DAPA <i>et al.</i> , 2013
<i>cwp84</i>	A cepa R20291 com mutação para a deleção de <i>cwp84</i> apresentou uma redução significativa no acúmulo de biofilme <i>in vitro</i> . Contraditoriamente, a cepa 630, com esta mesma mutação apresentou um aumento na formação de biofilmes.	DAPA <i>et al.</i> , 2013; PANTALÉON <i>et al.</i> , 2014
<i>fliC</i>	Cepas R20291 de <i>C. difficile</i> mutantes para o	DAPA <i>et al.</i> , 2013

	gene <i>fliC</i> produziram menos biofilmes do que as cepas do tipo selvagem.	
<i>luxS</i>	Observou-se uma redução significativa na formação de biofilme em cepas R20291 de <i>C. difficile</i> mutante para <i>luxS</i> quando comparado ao tipo selvagem.	DAPA <i>et al.</i> , 2013
<i>pilA1</i>	O mutante de <i>C. difficile</i> (R20291) <i>pilA1</i> , formou um biofilme inicial com massa e espessura significativamente reduzidas quando comparado ao tipo selvagem.	MALDARELLI <i>et al.</i> , 2016b
<i>dnaK</i>	A inativação do gene <i>dnaK</i> , na cepa 630 Δ erm, produz um fenótipo sensível à temperatura e com maior capacidade de formação de biofilme.	JAIN <i>et al.</i> , 2017
<i>dccA</i>	<i>dccA</i> , quando superexpresso, em cepas 630 Δ erm, não apenas aumenta o biofilme, mas também faz com que sua arquitetura se torne homogênea e altamente agregada	POQUET <i>et al.</i> , 2018

1.6.3 Antibioticoterapia e Biofilmes

As complicações decorrentes da ICD deixam os pacientes em risco de vida e requerem, portanto, diagnóstico e tratamento imediatos. A ICD deve ser tratada de acordo com a gravidade da doença e o risco de recorrência ou complicações. A primeira linha de tratamento consiste na administração de vancomicina e metronidazol (MTZ), sendo a vancomicina, o antibiótico de escolha quando a doença é considerada grave ou complicada. A fidaxomicina pode ser uma alternativa para ICD recorrente ou em casos em que o risco de recorrência é alto (BAGDASARIAN *et al.*, 2015). O uso de MTZ vem sendo pouco recomendado, desde o surgimento e disseminação de isolados clínicos de *C. difficile* resistentes a esta droga, o MTZ passou a ser indicado apenas como uma alternativa à vancomicina ou fidaxomicina para o tratamento inicial de ICD não grave.

Nos biofilmes, são observadas variações em termos de sensibilidades, às várias opções de tratamento antimicrobiano. Em 2018, James e colaboradores demonstraram que a fidaxomicina e a urotomicina eram significativamente mais eficazes em penetrarem e matar células vegetativas de *C. difficile* presentes em biofilmes de cepas RT078, quando comparado aos antibióticos VAN e MTZ. Apesar da antibioticoterapia, com MTZ, vancomicina ou fidaxomicina, serem a principal opção de tratamento contra a ICD, essa abordagem pode exacerbar ainda mais a disbiose intestinal e potencializar reinfecções.

A terapia com antimicrobianos demonstra eficácia reduzida contra biofilmes (MATHUR *et al.*, 2016). Os biofilmes de *C. difficile* mostraram resistência 100 vezes maior ao metronidazol e 10 vezes maior resistência à vancomicina do que células cultivadas em meio líquido (SEMENYUK *et al.*, 2014). Além disso, os antibióticos podem atuar como um fator de estresse, sendo a formação de biofilme uma reação defensiva à presença dessas substâncias (DAPPA *et al.*, 2013, VUOTTO *et al.*, 2016). Vuotto *et al.*, 2016 demonstraram que a produção de biofilme de *C. difficile* é induzida pela exposição ao MTZ em concentrações sub-inibitórias. Dapa *et al.*, 2013 também observou que a exposição a vancomicina em diferentes concentrações (0,5 µg e 0,25 µg/ml) pode estimular a formação de biofilme *in vitro* após 72h de incubação em cepas RT027.

Mathur *et al.*, 2016 ao comparar a eficiência de diferentes antibióticos (thuricin CD, tigeciclina, vancomicina, teicoplanina, rifampicina e nitazoxanida), independentes ou associados, contra cepas de *C. difficile*, verificou que a VAN foi ineficaz em reduzir a viabilidade das células presentes no biofilme de 4 cepas das 5 testadas. Além disso, todas as cepas apresentaram uma sensibilidade diferenciada aos demais antibióticos, por exemplo o

biofilme formado pela cepa RT027 foi sensível a tigeciclina e rifampicina, já a cepa DPC 6350 foi sensível teicoplanina e rifampicina. Essas diferenças na sensibilidade dos biofilmes aos antibióticos, levaram os autores a concluir que existem variações específicas da cepa, bem como da concentração, no que diz respeito à sensibilidade dos biofilmes de *C. difficile*.

A sensibilidade a antibióticos pode ser um fator que contribui para a formação de biofilmes. Estudos de Rahmoun *et al.*, 2021 ao analisar a capacidade de produção de biofilme em 123 isolados clínicos, observou que uma maior porcentagem de cepas com aumento de resistência aos antibióticos MTZ e VAN foram produtores de biofilmes, sugerindo que existe uma associação entre a redução da suscetibilidade a antibióticos e a capacidade de produção de biofilme.

In vivo, *C. difficile* pode formar biofilmes e consequentemente escapar de antibióticos usados para tratamento, resultando em infecções recorrentes. A natureza compacta do biofilme, bem como a presença da matriz extracelular, circundante às células, podem reduzir a penetração de antimicrobianos. Normington *et al.*, 2021 em seus estudos, usando um modelo de intestino *in vitro*, verificou que o tratamento de biofilmes multiespécies, tanto com vancomicina, quanto com transplante de microbiota fecal (FMT) não foram capazes de extinguir por completo as populações de *C. difficile* associadas ao biofilme, deixando deste modo uma fonte potencial para infecção recorrente.

Deshpande *et al.*, 2015 demonstrou em sua meta-análise que o uso de antibióticos é um fator de risco independente para *ICD* recorrente (RICD). RICD pode ser definido como um novo episódio da infecção ocorrendo no intervalo de 8 semanas de um episódio anterior. A recorrência ocorre em 30% dos casos após um primeiro tratamento com antimicrobianos. O risco de recorrência adicional após a melhora da primeira recorrência, é ainda maior, sendo observado em 45-64% dos casos. A maioria dos episódios de RICD é atribuída a cepa original, o que demonstra a capacidade do *C. difficile* em estar protegido contra o tratamento antimicrobiano (SONG *et al.*, 2019). Sabendo que essas características do biofilme são críticas, elas podem ser alvos úteis na busca de estratégias de tratamento da ICD. No entanto, poucos estudos foram realizados para avaliar a formação e caracterização do biofilme.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

- Comparar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de três cepas de *C. difficile* MLST Clado 2: ICC-45 (ribotipo SLO231/UK[CE]821) um toxinotipo ST41 IXb isolado no Brasil, com cepas epidêmicas NAP1/027/ST01, NAP1/027/ST01 (LIBA5756), isolado durante um surto de 2010 na Costa Rica, e a cepa epidêmica de referência NAP1/027/ST01 (R20291). ATCC700057 (uma cepa não toxigênica, foi usado como cepa de controle)

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* das cepas ICC-45 (ribotipo SLO231/UK[CE]821), NAP1/027/ST01 (LIBA5756; R20291) e ATCC700057;
- Detectar a expressão de TcdA em biofilmes *in vitro* das ICC-45 (ribotipo SLO231/UK[CE]821), NAP1/027/ST01 (LIBA5756; R20291) e ATCC700057;
- Analisar a resistência dos biofilmes formados pelas cepas ICC-45 (ribotipo SLO231/UK[CE]821), NAP1/027/ST01 (LIBA5756; R20291) e ATCC700057 aos antibióticos metrodinadozol e vancomicina;
- Avaliar a expressão gênica dos genes de virulência (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*, *slpA*, *cwp84*, *cwp66* e *spo0A*) nas cepas estudadas de *C. difficile*.

3 CAPÍTULO

REGIMENTO INTERNO

Esta Tese de Doutorado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigo científico e submetido à revista escolhida para publicação (Frontiers in Cellular and Infection Microbiology; ISSN: 2235-2988; Fator de impacto: 6,073; A1).

Comparative analysis of biofilms formation between hypervirulent strains of *Clostridioides difficile* MLST clade 2 isolated in Latin America with the reference epidemic NAP1/027 strain

Maria Luana Gaudencio dos Santos Morais^{1,2}, Mayara Gil de Castro Santos⁴, Cecília Leite Costa^{1,2}, Conceição Silva Martins¹, Renata Ferreira de Carvalho Leitão¹, Dvison de Melo Pacífico¹, Carlos Quesada-Gómez⁵, Débora Castelo Branco², Eliane de Oliveira Ferreira², Gerly Anne de Castro Brito¹

¹Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ²Laboratory of Bacteriology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ³Centers for Disease Control and Prevention, Division of Laboratory Sciences, Atlanta, GA, USA; ⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Laboratório de Biologia de Anaeróbios, Rio de Janeiro, Brazil; ⁵Facultad de Microbiología and Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Abstract

One of the difficulties in treating *Clostridioides difficile* infection (CDI) is that this bacterium forms biofilms, an important virulence mechanism known to promote antibiotic resistance and, as a result, consequently, a greater recurrence of the disease. The goal of this study was to compare the *in vitro* ability of three MLST Clade 2: ICC-45 (ribotype SLO231/UK[CE]821) a ST41 toxinotype IXb isolated in Brazil, to epidemic NAP1/027/ST01 strains NAP1/027/ST01 (LIBA5756), isolated during a 2010 outbreak in Costa Rica, and the reference epidemic strain NAP1/027/ST01 (R20291). ATCC700057, a non-toxigenic strain, was used as a control strain. Total biofilm biomass estimated by crystal violet staining was used to calculate strains' ability to form biofilm. In addition, samples were stained with the Film Tracer biofilm matrix (Invitrogen®) and the thickness of the biofilm matrix was measured using confocal microscopy. Scanning electron microscopy was used to determine matrix architecture. Confocal microscopy was used to detect the presence of toxin A (TcdA) using an anti-*Clostridioides difficile* TcdA antibody. We also looked at the expression of virulence genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*, *spo0A*, *slpA*, *cwp66* and *cwp84*), as well as the effect of antibiotics metronidazole (MTZ) and vancomycin (VAN) on biofilm growth. All the strains tested formed a moderate biofilm $1.1 <DO_{570nm}> 3.5$. After 72h, the epidemic NAP1/027/ST01 strains (LIBA5756 and R20291) biofilm biomass were significantly higher than ICC-45 and ATCC 700057 biofilm, which was corroborated by electron and confocal microscopy. At 120h, the LIBA5756 biofilm biomass decreased compared to other strains. ICC-45 had higher expression of genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *spo0A* than the toxigenic strains R20291 or LIBA 5756, however there were no significant difference in the expression levels of *cdtB*, *slpA*, *cwp66* and *cwp84*. VAN and MTZ caused an inhibitory effect in biofilm formation in epidemic strains, however for ICC-45 strain, MIC concentrations of VAN and MIC and 4MIC of MTZ did not inhibit biofilm formation. In conclusion, the three MLST Clade 2 from different ribotypes, two of them isolated from Latin America, are competent biofilm-forming bacterium, indicating its ability to induce the recurrence of *C. difficile* infection, making treatment difficult.

Keywords: *Clostridioides difficile*; infection; biofilm production.

1. Introduction

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a spore-forming, anaerobic bacterium, that is the main cause of nosocomial diarrhea associated with antibiotic use. *C. difficile* toxins A and B (TcdA, TcdB), as well as binary toxins (CDT) and its ability to form biofilm and produce spores are among the virulence factors linked to the emergence *C. difficile* infection (CDI) (Chandrasekaran and Lacy, 2017; de Melo Pacífico *et al.*, 2021). Furthermore, prolonged hospitalization, advanced age and excessive and inappropriate use of antibiotics are risk factors for CDI (Eze *et al.*, 2017). CDI symptoms can range from mild or severe diarrhea to serious

inflammatory conditions, pseudomembranous colitis, toxic megacolon, and sepsis (Czepiel *et al.*, 2018). Some of these CDI conditions are responsible for increased hospital stay length, which has an economic impact on the healthcare system (Lessa *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

The hospitalization rate for CDI increased from 2001 to 2011, when it stabilized (Marra *et al.*, 2020). This increase was primarily due to epidemic strains (NAP1, ribotype 027). NAP1/027 was also responsible for outbreaks in North American and in European countries and in Costa Rica (Warny *et al.*, 2005; Miao Heet *et al.*, 2008; Giancola *et al.*, 2018). In Brazil, the most common circulating ribotypes are 014, 043, 046, 106, 132, 133, 134, 135, 136, 142, 143, and 233 (Trindade *et al.*, 2019). However, a virulent MLST Clade 2 strain, ICC-45 (ribotype SLO231/UK[CE]821/ST41 toxinotype IXb), which is phylogenetically related to NAP1/RT027, was isolated in Northeast of Brazil (Costa *et al.*, 2016). Using a mouse ileal loop model, Costa *et al.*, 2016 demonstrated that ICC-45 causes inflammation, oxidative stress, and epithelial damage similar to NAP1/027.

One of the important aspects of CDI is its proclivity for recurrence, which occurs in 20% to 25 % of patients within 4 weeks post-anti-*C. difficile* treatment (Garey *et al.*, 2008; Childs, 2018). Moreover, patients with recurrence have a higher risk of death than CDI patients who do not develop a recurrence (Olsen *et al.*, 2015). CDI recurrence may be linked to some of *C. difficile* virulence factors, such as TcdA and TcdB production, spore persistence and biofilm formation (Pantaléon *et al.*, 2015; Maldarelli *et al.*, 2016; Hamada *et al.*, 2020).

Structured bacterial communities produce biofilms to adhere to a surface, which are then encased in a self-produced extracellular matrix composed of proteins, polysaccharides, DNA, and other components (Flemming *et al.*, 2016; Karygianni *et al.*, 2020). The extracellular matrix acts as a physical barrier to external stresses, help to preserves nutrients, allows for antibiotic resistance, and protects against oxidative stress (Dawson *et al.*, 2012; Dapa and Unnikrishnan, 2013).

Knowing that these biofilm characteristics are critical for persistent disease, they may be useful targets in the search for CDI treatment strategies. However, few studies have been conducted to evaluate biofilm formation and characterization. Based on this, this study aimed to compare the biofilm formation capacity and biofilm features of three MLST Clade 2 strains: ICC-45 (ribotype SLO231/UK[CE]821), a ST41 toxinotype IXb isolated in Brazil, epidemic strains LIBA5756 (NAP1/027/ST01), isolated during a 2010 outbreak in Costa Rica, and the reference strain R20291 (NAP1/027/ST01).

2. Methodology

2.1. Bacterial strain and culture conditions

A total of four *C. difficile* strains were studied: a toxigenic pulsotype and PCR ribotype: SLO231/UK[CE]821 (ICC45) isolated in oncology hospital in Brazil; a NAP1/ST01/RT027 strain (LIBA 5756) isolated from an outbreak in a hospital in Costa Rica; a reference epidemic strain NAP1/027/ST01 (R20291) and a non-toxigenic *C. difficile* ATCC 700057 used as a control. All *C. difficile* strains were grown on Brucella Agar (Oxoid® - Thermo Fisher Scientific), supplemented with 0.1 % vitamin K, 0.1 % hemin (Sigma®) and 5% defibrinated sheep blood and in BHI (Brain Heart infusion) broth supplemented with, 0.1% L-Cysteine, 0.1 % vitamin K, 0.4% yeast extract and 0.1% hemin. The plates and tubes were incubated at 37 °C in anaerobic jars containing an AnaeroGen™ atmosphere generation system (Oxoid® - Thermo Fisher Scientific).

2.2. Biofilm formation assay and measurement of biofilm biomass

The protocol for the biofilm assays was adapted from Dapa *et al.*, 2013. Biofilm tests were performed in 24-well polystyrene plates. An overnight (16h) *C. difficile* culture in BHI broth was diluted in a fresh BHI supplemented with 1.8% glucose (BHISG) and 10µl inocula at 0.5 on McFarland turbidity scale added to each well, containing 900 µl of BHISG (1:100).

Plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions for 24, 48, 72 and 120 h. After removing the supernatant, the wells were rinsed twice with PBS and allowed to dry for 10 min. The biofilm was stained for 30 min with 1 ml of 0.2% crystal violet (CV) and incubated at 37°C. CV was removed from the wells and washed twice with sterile PBS. One milliliter of ethanol: acetone (80:20) was used to solubilize the CV and its optical density (OD) was measured at 570nm using spectrophotometer Ultrospec 500*pro* (Amersham Biosciences). Strains were classified into three groups based on the ability to form a biofilm, according to Pantaléon *et al.* 2018 (Pantaléon *et al.*, 2018): low-biofilm formers ($OD_{570} < 1.1$), moderate-biofilm formers ($1.1 < OD_{570} < 3.5$) and high biofilm formers ($OD_{570} > 3.5$).

2.3 Scanning electron microscopy - SEM

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was used to characterize the *C. difficile* biofilm structure, as described in Pantaleon *et al.*, 2015 (Pantaléon *et al.*, 2015), with modifications. Briefly, *C. difficile* strains were grown onto coverslips with a diameter of 13 mm according to the section biofilm formation in order to analyze the structure of the biofilm of each strain after 72 h. Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 30 min and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 15 min. Samples were dehydrated in a series of ethanol (15%, 30%, 50%, 70%, 90% and 100%), critical point-dried in CO₂ and mounted on specimen stubs. Stubs were sputtered with a thin layer of gold using a Balzer's apparatus and examined in a Quanta 450 scanning electron microscope (FEI Company) at Central analytical of Federal University of Ceará.

2.4. Confocal Laser Scanning Microscopy

Biofilm matrix was analyzed by using a FilmTracer Sypro Ruby biofilm matrix staining assay and confocal laser scanning microscopy (CLSM) according to Lázaro-Díez *et al.*, 2015

(Lazaro-Diez *et al.*, 2016). . Each *C. difficile* strain was diluted in a fresh BHI supplemented with 1.8% glucose (BHISG) and 3 μ L inocula at 0.5 on McFarland turbidity scale was added in an 8-well polystyrene plates containing 297 μ l of BHISG (1:100). Plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions for 72h. Following that, the supernatant was removed, the wells were rinsed twice with PBS and then the biofilm was stained with FilmTracer Sypro Ruby biofilm matrix (Invitrogen), 200 μ l per well and incubated for 30 min at 37°C in the dark. A LSM 510 microscope (Zeiss) was used to examine the samples. Film Tracer exhibits an excitation at 488 and 561 nm and emits fluorescence at 500 and 550 nm, respectively. The thickness was calculated directly from the confocal stack images using the LEICA software.

To investigated TcdA levels in *C. difficile* strains which were grown according to the section biofilm formation onto coverslips (13 mm diameter) for 72h. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at pH 7.6, washed with PBS, and permeabilized for 5 min with 0.1% Triton X-100 in PBS. After that, the samples were then blocked for 1 h with PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA). Anti-*C. difficile* toxin A antibody (1:300, Abcam) was applied to the biofilm overnight at 4°C, followed by a secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 596 (1:1000) for 1 h at room temperature. A confocal laser scanning microscope (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Germany) was used to capture the images. Using LEICA software, the fluorescence intensity was calculated directly from the confocal stack images.

2.5 RNA extraction and RT-qPCR analysis

C. difficile strains were grown according to the Biofilme section 2.2. After 72h the supernatant was removed, and the cells were washed in PBS at 4°C. BHI was used to disrupt and resuspend the biofilms. Following the manufacturer's instructions, RNA was isolated from bacterial pellets obtained after centrifuging the culture (14.812 g) using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). The RNA concentrations were determined using the Nanodrop and following this step, cDNA was

acquired using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). To amplify the genes tested, the SYBR Green PCR master mix kit (Life Technologies) was used, and the 16S rRNA gene was used as an internal control gene. Table 1 lists the oligonucleotide primers. The analyses were carried out using the BioRad CFX96 Real Time PCR instrument.

2. 6 Efficacy of Anti-*C. difficile* antimicrobials against *C. difficile* biofilms

The antimicrobial effect was adapted from Costa *et al.*, 2021. After 72 h of biofilm growth for in 96-well plates, the supernatants were removed and 200µl of BHISG glucose broth containing metronidazole (MTZ) or Vancomycin (VAN) was added to each well. CV was used to measure biofilm biomass after 48h under anaerobic incubation. MTZ and VAN were tested at ten two-fold increasing concentrations, ranging from 2 to 1024 µg/mL and from 0.125 to 64 µg/mL, respectively. For each strain, drug-free and bacterium-free wells were included as growth and sterility controls, respectively.

2.7 Statistical analysis

GraphPad Prism 7 software was used to perform the statistical analysis. Analysis of variance, followed by the post hoc Bonferroni or Tukey's test was used to compare results that demonstrating a parametric distribution and Kruskal-Wallis' followed by Dunn's test for non-parametric analysis. The significance level of 5% was considered statistically significant conclusions.

3. Results

3.1 *Clostridioides difficile* formation of biofilms *in vitro*

Using a 24-well microtiter plate crystal violet binding assay, a total of four *C. difficile*

strains were tested for biofilm formation. The Table 1 displays the strain characteristics and Pantaléon's biofilm classification (Pantaléon *et al.*, 2018).

As shown in **Fig. 1**, the strains ICC45, NAP1/027/ST01 (LIBA5756 and R20291) and the control strain ATCC 700057 were capable of producing biofilm *in vitro* since 24h to 120h.

At 48h three clinical *C. difficile* strain had similar performance in forming biofilm, but at 72h the epidemic strains NAP1/RT027 (LIBA5756 and R20291) showed higher biofilm biomass than that of the ICC45 and ATCC 700057 strains. However, after 120 h (**Fig. 1**) of incubation, ICC-45 and R20291 showed persistence in biofilm formation, both strains having a biofilm formation capacity significantly higher than LIBA 5756.

3.2 ICC-45 presents a biofilm consistent with interconnected cells

SEM was used to perform a qualitative analysis on the architecture of the biofilms. SEM revealed wide mats of rod-shaped vegetative cells with interconnected cells in all strains examined after 72 hours of incubation. The NAP1/027 strains exhibited a dense biofilm with masses of agglomerated cells (**Fig. 2C and D** compared to ICC-45 (**Fig. 2B**) and ATCC 700057 image which present more empty spaces (**Fig. 2A**). In the ICC45 biofilm, ovoid cells were observed, which appears to be spores.

3.3 The biofilm matrix of ICC-45 was similar to the biofilm of virulent strains

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was also used to examine the architecture of the biofilms. CLSM analysis revealed that biofilms formed by clinical strains have a denser structure, thickness, and fluorescent intensity than non-toxicogenic strain. Figure 3A depicts representative images of the biofilms formed after 72 hours of incubation. When compared to other strains, ATCC 700057 biofilms have a low-density matrix, which is consistent with the low biofilm biomass produced at this time. Moreover, the ATCC 700057 matrix thickness (**Fig. 3B**) was significantly lower than the ICC-45 ($13.44 \mu\text{m} \pm 3.44 \mu\text{m}$), LIBA 5756 ($12.41 \mu\text{m} \pm$

0.5 μm), and R20291 (13.61 $\mu\text{m} \pm 1.8 \mu\text{m}$). As a result, ATCC 700057's fluorescent intensity figure (**Fig. 3C**) was lower than that of the other strains.

3.4 Toxin A production

The biofilms were incubated with anti-toxin A antibody to determine TcdA production, and the fluorescent intensity was measured using CLSM. It was observed a lower intensity of fluorescence for the strains ATCC 700057 and ICC-45 in the representative images (**Fig. 4A**) and the fluorescent intensity quantification (**Fig. 4B**) revealed that ICC-45 (3.07 \pm 1.26) produced less TcdA than LIBA 5756 (11.65 \pm 2.0) and R20291 (15.93 \pm 6.32). There were no differences between the strains LIBA 5756 and R20291.

3.5 Expression of genes associated with virulence

A qRT-PCR assay was used to investigate *C. difficile* virulence factors. The ICC-45 strain showed higher levels of *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *slpA* and *spo0A* expression than the toxigenic R20291 and LIBA 5756 strains. There was no significant difference in the expression levels of *cdtB*, *cwp66* and *cwp84* between the ICC-45 and NAP1/027 strains (**Fig. 5**).

3.6 Effects of metronidazole and vancomycin on *C. difficile* biofilms

The effect of antimicrobials against *C. difficile* strains was determined first in planktonic cells using the broth microdilution method. VAN MIC ranged from 0.5 to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all strains (Table 3) MTZ MICs were 2 to ATCC 700057, LIBA 5756 and R20291 (Table 3), while ICC-45 was 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The effects of VAN or MTZ on *C. difficile* biofilm formation were investigated at MIC, 4xMIC, and 8xMIC. The effects of VAN or MTZ caused a dose-dependent inhibitory effect in biofilm formation in epidemic strains, resulting in a significant reduction of

biofilm biomass (**Fig. 6** and **7 A-D**). Except for ICC-45 strain, which MIC concentrations of VAN and MIC and 4MIC of MTZ did not inhibit biofilm formation (**Fig. 6B** and **7B**).

3. DISCUSSION

Here, we demonstrated that the three MLST Clade 2 evaluated are competent biofilm-forming bacteria. It is well established that microbial biofilm represents an important virulence factor associated with the pathogenesis of *C. difficile* and its recurrent infections, as it contributes to the bacterium's survival. In fact, the biofilm influences antimicrobial resistance and protects bacteria against environmental stress and the host's immune response (Soavelomandroso *et al.*, 2017; Dapa *et al.*, 2013). Thus, biofilm characterization provides a better understanding of strain behavior and can help in the design of novel strategies to prevent or treat *C. difficile* infection.

Among the strains tested, the epidemic NAP1/027/ST01 (RT027) was involved in outbreaks and more severe infections in North America and Europe. The NAP1/027/ST01 (LIBA5756), was isolated during a 2010 outbreak in Costa Rica. In Brazil, however, NAP1/027/ST1 has not been detected as causing outbreaks. The *C. difficile* strain ICC-45, recovered from a cancer patient in Brazil who died from severe diarrhea, is toxigenic (tcdA⁺, tcdB⁺ and ctdB⁺) but, different from NAP1/027 is susceptible to fluoroquinolones and does not overproduce toxins TcdA and TcdB. Although, ICC45 encodes for a variant TcdB and produces similar expression of pro-inflammatory cytokines, epithelial damage, and oxidative stress response in the mouse ileal loop model (Costa *et al.*, 2016).

In the present study, all the strains, including the control strain ATCC 700057, were capable of producing moderate biofilms *in vitro* ($1.1 <DO_{570}>3.5$), after 24, 48, 72 and 120h of incubation, according to Pantaleon *et al.* (2018) classification. Despite the fact that LIBA 5756 produced the greatest biofilm biomass after 48h, its production significantly decreased after

120h when compared to the biofilm production capacity of ICC45. Interestingly, the ICC-45 biofilm remained similar to the R20291 biofilm after 120h, which may contribute to its virulence and antibiotic resistance. These findings support previous research indicating that the biofilm formation is time and strain dependent (Dapa *et al.*, 2013; Walter *et al.*, 2015; Vuotto *et al.*, 2018).

Biofilm formation has been associated with important aspects of colonization and persistence *in vivo* (Pizarro-Guajardo *et al.*, 2016). The extracellular matrix is essential for the maintenance of the biofilm, as it creates a stable microenvironment (Karygianni *et al.*, 2020), which provides greater protection to the microorganisms contained within the biofilm (Yin *et al.*, 2019). After investigating the biofilm architecture and thickness it was observed that in 72h ATCC 700057 strain presented a matrix with isolated cells, while ICC-45, LIBA 5756 and R20291 have similar thickness with a dense biofilm matrix. These properties may provide greater protection to the microorganisms contained within the biofilm (Yin *et al.*, 2019). Moreover, this matrix is an important reservoir of spores and toxins, both of which can contribute to disease recurrence and thus complicate the make treatment of the diseased patient (Frost *et al.*, 2021).

Subsequently to the investigation of the architecture and thickness of biofilms, we examined its extracellular matrix, as well as the cells embedded within the matrix, by SEM. After 72h, the ATCC 700057 exhibited less thick biofilm, while the epidemic NAP1/027 strains exhibited a dense biofilm with masses of agglomerated cells. It was observed small ovoid structures in the ICC-45 biofilm, suggesting spore accumulation. Similar findings were found in the biofilm of another strain of *C difficile* and the authors later identified these ovoid cells as spores, using transmission electron microscopy (Semeyuk *et al.*, 2014). Spores are a bacterial survival structures that can resist antibiotic treatment, contributing to disease recurrence and making it hard to treat (Frost *et al.*, 2021). A study conducted by James and colleagues (2018)

revealed that antibiotics like MTZ and VAN are ineffective in reducing the number of spores within a biofilm when compared to other antibiotics. In accordance, we observed in the present study that ICC-45 strain is more resistant to VAN or MTZ compared to epidemic strains. We should also consider that the antibiotic resistance observed in the ICC-45 biofilm can also be attributed to the presence of specific extracellular matrix proteins, since we have previously showed that ICC-45 produces and expresses more proteins related to antibiotic resistance of the beta-lactamases family, pyruvate-ferredoxin oxidoreductase and nitroreductase when compared to strain NAP1/027 (LIBA 5756) (de Melo Pacífico *et al.*, 2021).

C. difficile sporulation, although not fully understood, is linked with *B. subtilis* *spo0A* gene, which is the master regulator of sporulation in all endospore-forming bacteria (DiCandia *et al.*, 2022). In our study, the ICC-45 biofilm exhibited a higher *spo0A* gene expression in 3-day-old biofilm, compared to the toxigenic R20291 and LIBA 5756 strains. This result may indicate that ICC-45 sporulation process begins earlier for this strain, which may contribute to the virulence.

In the present study, we also investigated the *C. difficile* TcdA protein expression, based on the study by Semenyuk *et al.* (2014) who reported higher toxin levels in *C. difficile* biofilms after 3 days. In fact, TcdA levels from the matrix of 72h-old biofilms from LIBA 5756 and R20291toxigenic strains were higher compared to both ATCC 700057 (non-toxigenic) and ICC-45 biofilms. Our result is in agreement with a previous study that reported lower release of TcdA by the ICC-45 strain compared to NAP1/027, using WB (Costa *et al.*, 2016). However, another study of our group, using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, demonstrated increased proportions of TcdA in the exoproteome of ICC-45 when compared with NAP1/027 (de Melo Pacífico *et al.*, 2021). We speculate that this divergence may be the result of different techniques and cultivation times between the studies and mainly the fact that the results presented here, different from the previous studies, were evaluated in

biofilm. Interestingly, here, the 72h-old ICC-45 biofilm exhibited higher gene expression of *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *slpA* and *spo0A* than the toxigenic R20291 and/or LIBA 5756 strains. Considering that mRNA is eventually translated into protein, this result may indicate a subsequent increase in TcdA production by the ICC-45 biofilm after 72h, but further studies are needed to confirm that hypothesis.

The adhesion of *C. difficile* to the host colon epithelial cells is an essential *step* in the pathogenesis of *C. difficile* toxin-induced intestinal injury. Therefore, we examined the gene expression of *C. difficile* cell surface-associated proteins, such as cwp66 and cwp84, both proteins from the Cell Wall Protein (Cwp) family. Our study showed similar gene expressions of cwp66 and cwp84 in the biofilms of all evaluated strains, after 72h of incubation. Maldarelli *et al.*, reported cwp66 expression in a 1-week-old biofilm formed by *C. difficile* (Maldarelli *et al.*, 2016). On the other hand, the ICC-45 biofilm showed a greater *slpA* gene expression when compared to the biofilms from LIBA 5756 and R20291 toxigenic strains. *SlpA*, is a single gene that encodes *surface layer (S-layer) proteins* (Bradshaw *et al.*, 2013). S-layers allow bacteria to adhere to host cells or other environmental surfaces and protect the cell from aggressions such as phagocytosis and harmful enzymes (Fagan and Fairweather, 2014). It has been described that S-layer is required for *C. difficile* biofilm formation (Dapa *et al.*, 2013).

In conclusion, this study demonstrated that the three MLST Clade 2, from different rybotypes, two of them isolated from Latin America, are competent biofilm-forming bacterium, indicating its ability to induce the recurrence of *C. difficile* infection, making treatment difficult. In the current study, ICC-45 biofilm showed higher resistance to VAN and MTZ. These feature is associated with increased expression of *SlpA* and *Spo0A*, genes linked to adherence and sporulation and also linked to biofilm formation. Our results draw attention to epidemiology surveillance focused on the emergence of resistant and recurrence-causing strains, in the face of a globalized world.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could appear to have influenced the work described in this paper.

Acknowledgments

The authors thank Central analytical, Ceará Federal University, for logistical support. The M. L. G. S. M. is a recipient of a grant of the coordination of higher education personnel [CAPES]. This study was supported by PRONEX/FUNCAP/CNPq of Brazil through Grant PR2-0101-00060.01.00/15

REFERENCES

- Bradshaw, W. J., Roberts, A. K., Shone, C. C., and Acharya, K. R. (2018). The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*. *Journal of Cell Communication and Signaling* 12, 319–331. doi: 10.1007/s12079-017-0429-z.
- Chandrasekaran, R., and Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 723–750. doi: 10.1093/femsre/fux048.
- Childs, J. M. (2018). On Behalf of Workers: *Christian Social Teachings* 20, 218–223. doi: 10.2307/j.ctt22nm868.31.
- Costa, C. L., Azevedo, C. P. de, Quesada-Gómez, C., Brito, G. A. de C., Regueira-Neto, M. da S., Guedes, G. M. de M., *et al.* (2021). Inhibitory effect of Brazilian red propolis on planktonic and biofilm forms of *Clostridioides difficile*. *Anaerobe* 69. doi: 10.1016/j.anaerobe.2021.102322.
- Costa, C. L., López-Ureña, D., de Oliveira Assis, T., Ribeiro, R. A., Silva, R. O. S., Rupnik, M., *et al.* (2016). A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. *Anaerobe* 40, 76–84. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.005.
- Crowther, G. S., Wilcox, M. H., and Chilton, C. H. (2016). An *in vitro* model of the human colon: Studies of intestinal biofilms and *Clostridium difficile* infection. *Methods in Molecular Biology* 1476, 223–234. doi: 10.1007/978-1-4939-6361-4_17.
- Czepiel, J., Mirosław, D., Pituch, H., and Biesiada, G. (2018). *Clostridium difficile* infection: A review. *Reviews in Medical Microbiology* 29, 103–109. doi: 10.1097/MRM.000000000000135.
- Dapa, T., and Unnikrishnan, M. (2013). Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes* 4, 397–402. doi: 10.4161/gmic.25862.
- Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E. H., Wren, B. W., and Popoff, M. R. (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. *PLoS ONE* 7. doi: 10.1371/journal.pone.0050527.
- de Melo Pacífico, D., Costa, C. L., Moura, H., Barr, J. R., Maia, G. A., Filho, V. B., *et al.* (2021). Exoproteomic analysis of two MLST clade 2 strains of *Clostridioides difficile*

- from Latin America reveal close similarities. *Scientific Reports* 11, 1–8. doi: 10.1038/s41598-021-92684-0.
- DiCandia, M. A., Edwards, A. N., Jones, J. B., Swaim, G. L., Mills, B. D., and McBride, S. M. (2022). Identification of functional Spo0A residues critical for sporulation in *Clostridioides difficile*. *bioRxiv*, 2022.02.07.479450. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.07.479450v1><https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.07.479450v1.abstract>.
- Eze, P., Balsells, E., Kyaw, M. H., and Nair, H. (2017). Risk factors for *Clostridium difficile* infections - An overview of the evidence base and challenges in data synthesis. *Journal of Global Health* 7, 1–9. doi: 10.7189/jogh.07.010417.
- Fagan, R. P., and Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* 12, 211–222. doi: 10.1038/nrmicro3213.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14, 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., *et al.* (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 529–549. doi: 10.1128/CMR.00082-09.
- Garey, K. W., Sethi, S., Yadav, Y., and DuPont, H. L. (2008). Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection* 70, 298–304. doi: 10.1016/j.jhin.2008.08.012.
- Giancola, S. E., Williams, R. J., and Gentry, C. A. (2018). Prevalence of the *Clostridium difficile* BI/NAP1/027 strain across the United States Veterans Health Administration. *Clinical Microbiology and Infection* 24, 877–881. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.011.
- Hamada, M., Yamaguchi, T., Ishii, Y., Chono, K., and Tateda, K. (2020). Inhibitory effect of fidaxomicin on biofilm formation in *Clostridioides difficile*. *Antonie van Leeuwenhoek* 116, 685–692. doi: 10.1007/s12220-020-00934-8.
- He, M., Miyajima, F., Roberts, P., Ellison, L., Pickard, D. J., Martin, M. J., *et al.* (2013). Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature Genetics* 45, 109–113. doi: 10.1038/ng.2478.
- Id, L. R. F., Id, J. K. J. C., and Id, M. U. (2021). *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? 1–6. doi: 10.1371/journal.ppat.1009348.
- James, G. A., Chesnel, L., Boegli, L., Pulcini, E. de L., Fisher, S., and Stewart, P. S. (2018). Analysis of *Clostridium difficile* biofilms: Imaging and antimicrobial treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73, 102–108. doi: 10.1093/jac/dkx353.
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., and Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology* 28, 668–681. doi: 10.1016/j.tim.2020.03.016.
- Lessa, F. C., Mu, Y., Bamberg, W. M., Beldavs, Z. G., Dumyati, G. K., Dunn, J. R., *et al.* (2015). Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *New England Journal of Medicine* 372, 825–834. doi: 10.1056/nejmoa1408913.
- Maldarelli, G. A., Piepenbrink, K. H., Scott, A. J., Freiberg, J. A., Song, Y., Achermann, Y., *et al.* (2016). Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Pathogens and Disease* 74, 1–10. doi: 10.1093/femspd/ftw061.
- Marra, A.R., Perencevich, E.N., Nelson, R.E., Samore, M., Khader, K., Chiang, H. Y. *et al.* (2020). Incidence and outcomes associated with *Clostridium difficile* infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Network Open* 3, e1917597. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.17597
- Olsen, M. A., Yan, Y., Reske, K. A., Zilberberg, M. D., and Dubberke, E. R. (2015). Recurrent *Clostridium difficile* infection is associated with increased mortality. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 164–170. doi: 10.1016/j.cmi.2014.08.017.
- Pantaléon, V., Bouttier, S., Soavelomandroso, A. P., Janoir, C., and Candela, T. (2014). Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe* 30, 193–198. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.05.002.

- 10.1016/j.anaerobe.2014.09.010.
- Pantaléon, V., Monot, M., Eckert, C., Hoys, S., Collignon, A., Janoir, C., *et al.* (2018). *Clostridium difficile* forms variable biofilms on abiotic surface. *Anaerobe* 53, 34–37. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.05.006.
- Piepenbrink, K. H., Maldarelli, G. A., Martinez De La Peña, C. F., Dingle, T. C., Mulvey, G. L., Lee, A., *et al.* (2015). Structural and evolutionary analyses show unique stabilization strategies in the type IV Pili of *Clostridium difficile*. *Structure* 23, 385–396. doi: 10.1016/j.str.2014.11.018.
- Pizarro-Guajardo, M., Calderón-Romero, P., and Paredes-Sabja, D. (2016). Ultrastructure variability of the exosporium layer of *Clostridium difficile* spores from sporulating cultures and biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 5892–5898. doi: 10.1128/AEM.01463-16.
- Semenyuk, E. G., Laning, M. L., Foley, J., Johnston, P. F., Knight, K. L., Gerding, D. N., *et al.* (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS ONE* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0087757.
- Soavelomandroso, A. P., Gaudin, F., Hoys, S., Nicolas, V., Vedantam, G., Janoir, C., *et al.* (2017). Biofilm structures in a mono-associated mouse model of *Clostridium difficile* infection. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2017.02086.
- Trindade, C. N. R., Domingues, R. M. C. P., and Ferreira, E. O. (2019). The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. *Anaerobe* 58, 13–21. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.03.002.
- Vuotto, C., Donelli, G., Buckley, A., and Chilton, C. (2018). *Clostridium difficile* biofilm. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1050, 97–115. doi: 10.1007/978-3-319-72799-8_7.
- Walter, B. M., Cartman, S. T., Minton, N. P., Butala, M., and Rupnik, M. (2015). The SOS response master regulator LexA is associated with sporulation, motility and biofilm formation in *Clostridium difficile*. *PLoS ONE* 10, 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0144763.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., *et al.* (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366, 1079–1084. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67420-X.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., and He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences* 20. doi: 10.3390/ijms20143423.
- Zhang, S., Palazuelos-Munoz, S., Balsells, E. M., Nair, H., Chit, A., and Kyaw, M. H. (2016). Cost of hospital management of *Clostridium difficile* infection in United States—a meta-analysis and modelling study. *BMC Infectious Diseases* 16. doi: 10.1186/s12879-016-1786-6.

LEGENDS

Figure 1. Average biofilm formation of different *Clostridioides difficile* strains. Biofilm formation by strain ATCC 700057, ICC-45, and epidemic strains LIBA 5756, R20291, was measured by crystal violet staining. The biofilm formation was measured after 24h, 48h, 72h and 120 h of incubation. Error bars show standard deviations of three independent experiments, and the * represents significant differences among strains and sterility control (SC), # represents significant differences among strains. ($P < 0.05$). (One-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Figure 2. Scanning Electron microscopy (SEM) of biofilm formed by *Clostridioides difficile*. Representative SEM images of *C. difficile* biofilm architecture performed by ATCC 700057 (A) ICC-45 (B), and epidemic strains LIBA 5756 (C), R20291 (D) after 72h of incubation. Magnification of 5000 and 15.000 x. scale 5 and 20 μ m.

Figure 3. Confocal laser scanning microscopy analysis (CLSM) of 72h biofilms formed by *Clostridioides difficile*. Biofilm's matrix formation by strain ATCC 700057, ICC-45, and epidemic strains LIBA 5756, R20291, was analyzed by FilmTracer™ SYPRO™ Ruby Biofilm Matrix Stain. (A) 2 D and 2.5 D Representative CLSM images of *C. difficile* biofilms (B) Biofilm thickness in micrometers (C) Mean fluorescence relative units of biofilm matrix formation * represents significant differences among strains ($P < 0.05$). Scale 20 μ m. (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test).

Figure 4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) of toxin A production in 72h biofilms formed by *Clostridioides difficile*. Biofilm's TcdA production by strain ICC-45, epidemic strains LIBA 5756, R20291 and ATCC 700057 (used as control) was analyzed by immunostaining with anti-*C. difficile* toxin A antibody. (A) Representative CLSM images of TcdA production by *C. difficile* biofilms (B) Mean fluorescence relative units of TcdA production by *C. difficile* biofilms. * represents significant differences among strains ($P < 0.05$). Scale 10 μ m. (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test).

Figure 5. Biofilm-related gene expression of *C. difficile* strain ICC-45, epidemic strains LIBA 5756, R20291 and ATCC 700057 after 72h. * represents significant differences among strains ($P < 0.05$). (One-way ANOVA followed by Tukey test).

Figure 6. Effect of Vancomycin on growing biofilms of *C. difficile* strains ATCC 700057 (**A**) ICC-45 (**B**), and epidemic strains LIBA 5756 (**C**), R20291 (**D**). *indicates statistically significant differences between the tested concentrations and growth control (GC). (One-way ANOVA followed by Tukey test).

Figure 7. Effect of Metronidazole on growing biofilms of *C. difficile* strains ATCC 700057 (**A**) ICC-45 (**B**), and epidemic strains LIBA 5756 (**C**), R20291 (**D**). *indicates statistically significant differences between the tested concentrations and growth control (GC) ($P < 0.001$). (One-way ANOVA followed by Tukey test).

TABLES

Table1. Summary of Strains and their characteristics

Strain	Origin (geography)	Biofilm biomass (OD 570nm)				Strain typing			Classification
		Time				MLST	PCR-ribotype	Toxinotype	
		24 h	48 h	72 h	120h				
ATCC700057	EUA	1.53	2.08	1.47	1.62	ST48	038	Nontoxigenic	Moderate
ICC-45	Br	1.83	3.05	2.25	2.3	ST41	SLO231/UK [CE]821	IXb	Moderate
LIBA5756	CR	1.46	2.95	2.94	1.57	ST01	027	III	Moderate
R20291	UK	1.37	3.03	2.89	2.23	ST01	027	III	Moderate

Table 2. Primers used in this study for reverse transcription quantitative PCR.

Target gene	Sequence (5'-3')	product size
<i>tcdA</i>	5' CAGGGCTAATAGTTTGTTCACAGAACA 3' 5' CAACATCTAAATATACTCCGCCAAAA 3'	143
<i>tcdB</i>	5' AGCAGTTGAATATAGTGGTTTAGTTAGAGTTG 3' 5' CATGCTTTTTAGTTTCTGGATTGAA 3'	144
<i>tcdC</i>	5' GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCC 3' 5' TGAAAGACGACGAAAAGAAAGC 3'	150
<i>cdtA</i>	5' GATCTGGTCCTCAAGAATTTGGTT 3' 5' GCTTGTCCCTCCCATTTTCGATT 3'	103
<i>cdtB</i>	5' AAAAGCTTCAGGTTCTTTTGACAAG 3' 5' TGATCAGTAGAGGCATGTTTCATTG 3'	132

<i>slpA</i>	5' TGGAGTCATTGGATTGATTGATG 3' 5' ACTTTAGTTAGATTATGTTTAGAAATTGG 3'	150
<i>cwp84</i>	5' CACCAGTTGCCACCATCTT3' 5' TTGGTCTTACTACACCAGCA3'	150
<i>spo0A</i>	5' AGCGCAATAAATCTAGGAGCA 3' 5' AGGTTTTGGCTCAACTTGTGT 3'	117
16S rRNA	5' AGCGGTGAAATGCGTAGATAT 3' 5' CAG CGTCAGTTACAGTCCAGA 3'	-

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of MTZ and VAN against *Clostridioides difficile* strains.

Strain	Metronidazole (MIC 90%)	Vancomycin (MIC 90%)
ATCC 700057	2 µg/mL	0.5 µg/mL
ICC-45	16 µg/mL	1.0 µg/mL
LIBA 5756	2 µg/mL	0.5 µg/mL
R20291	2 µg/mL	0.5 µg/mL

MIC 90%- minimum inhibitory concentration at 90%

FIGURE 1

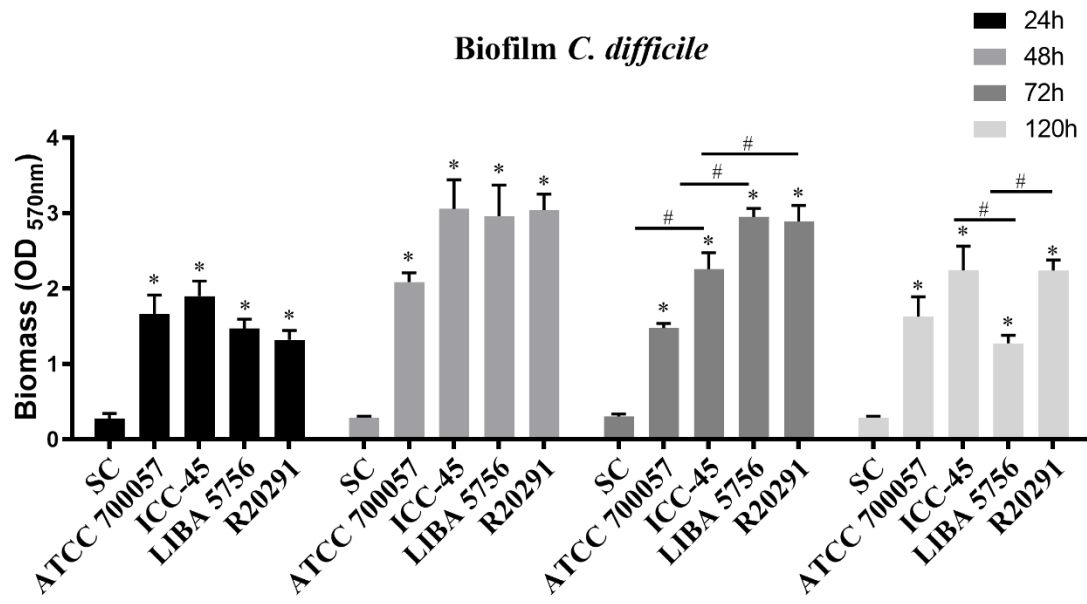


FIGURE 2

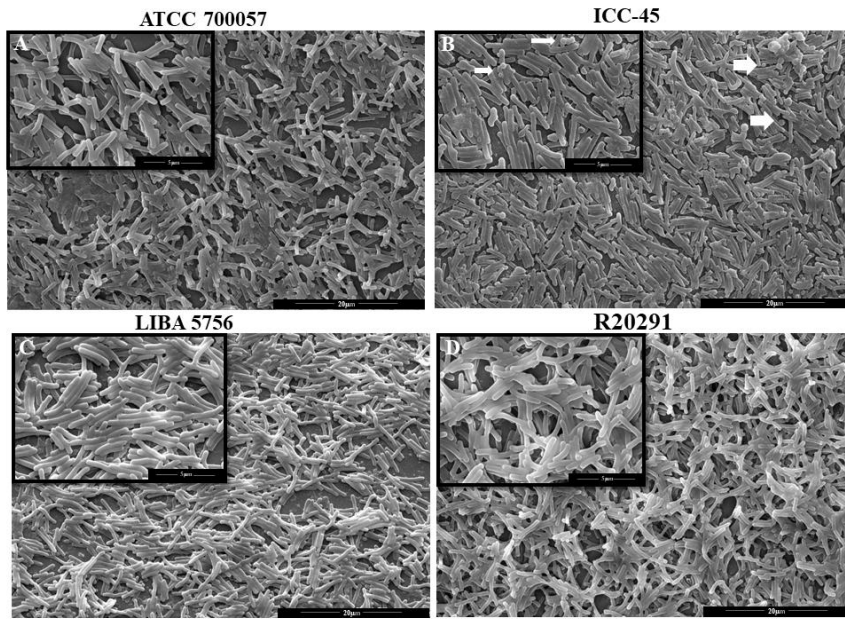


FIGURE 3

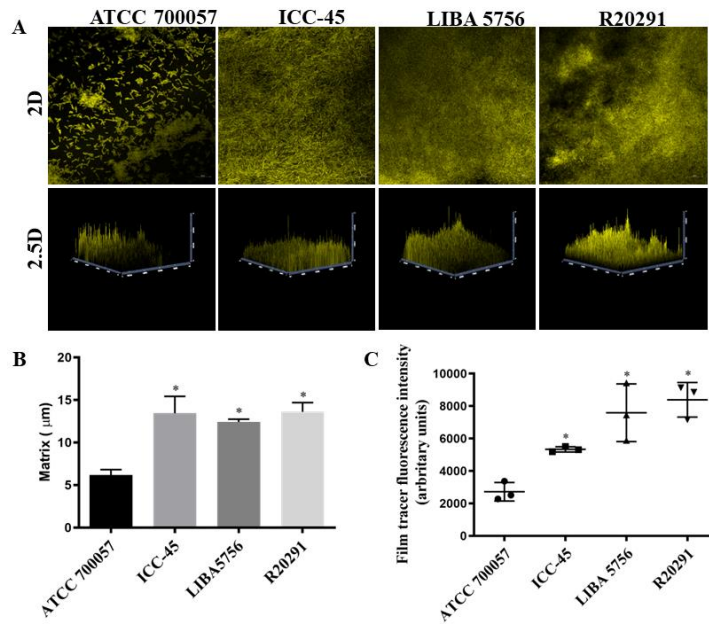


FIGURE 4

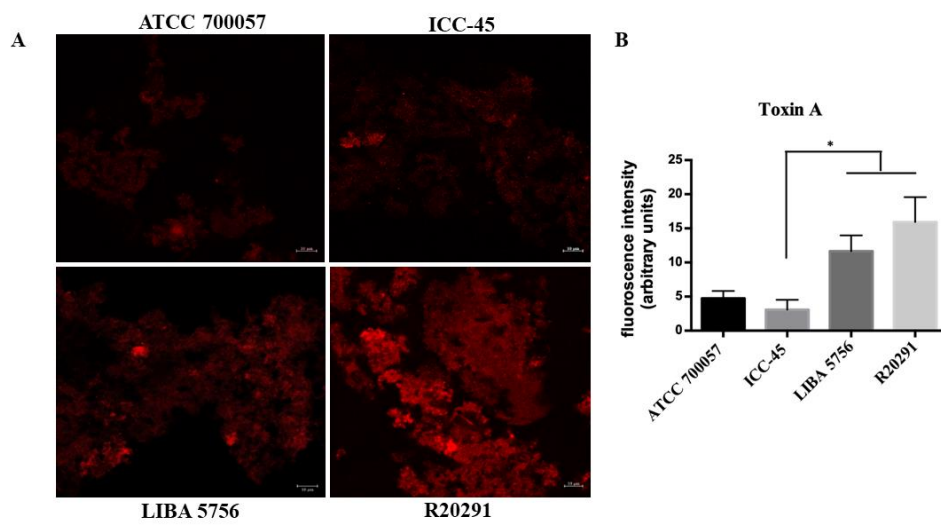


FIGURE 5

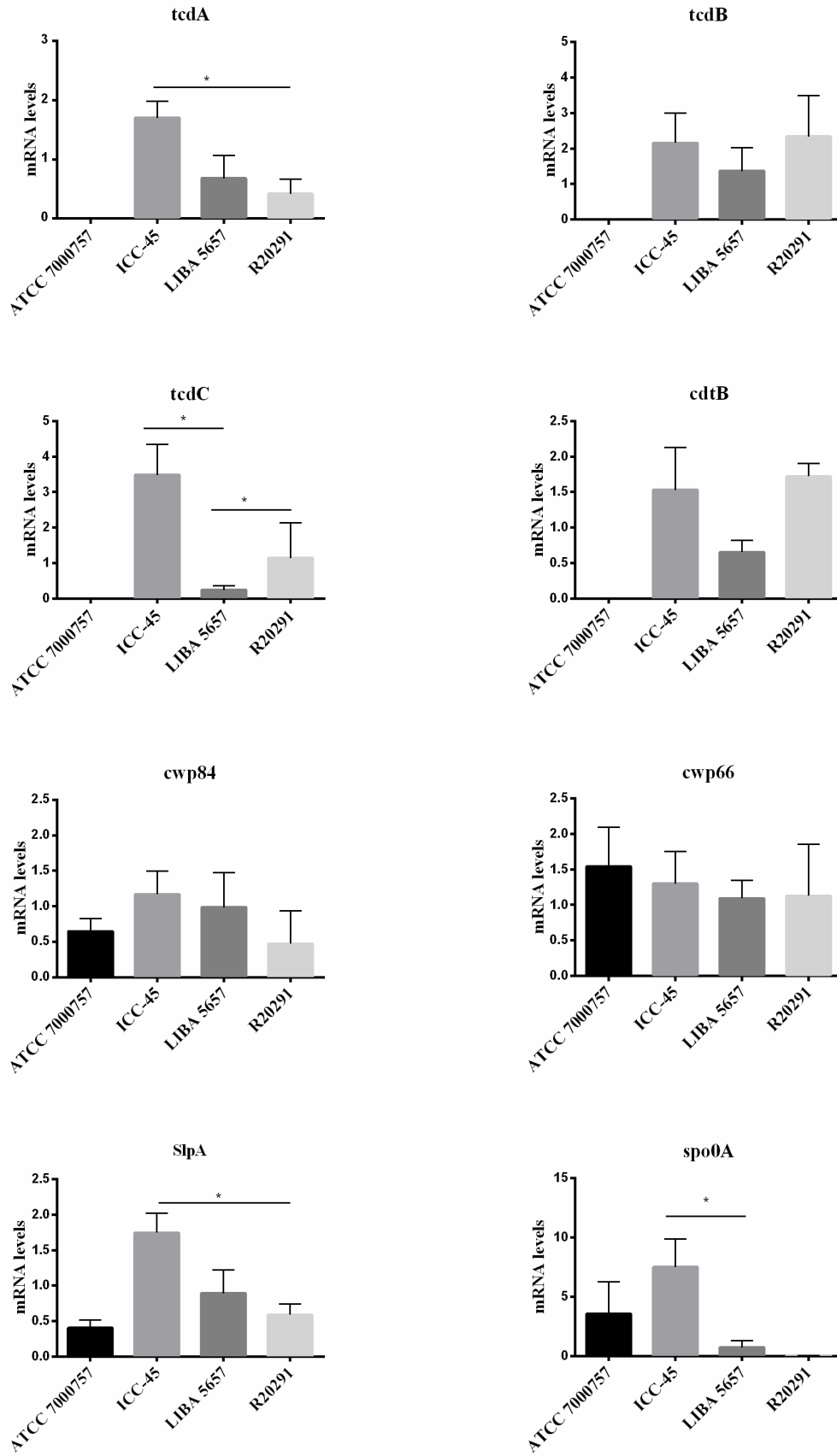


FIGURE 6

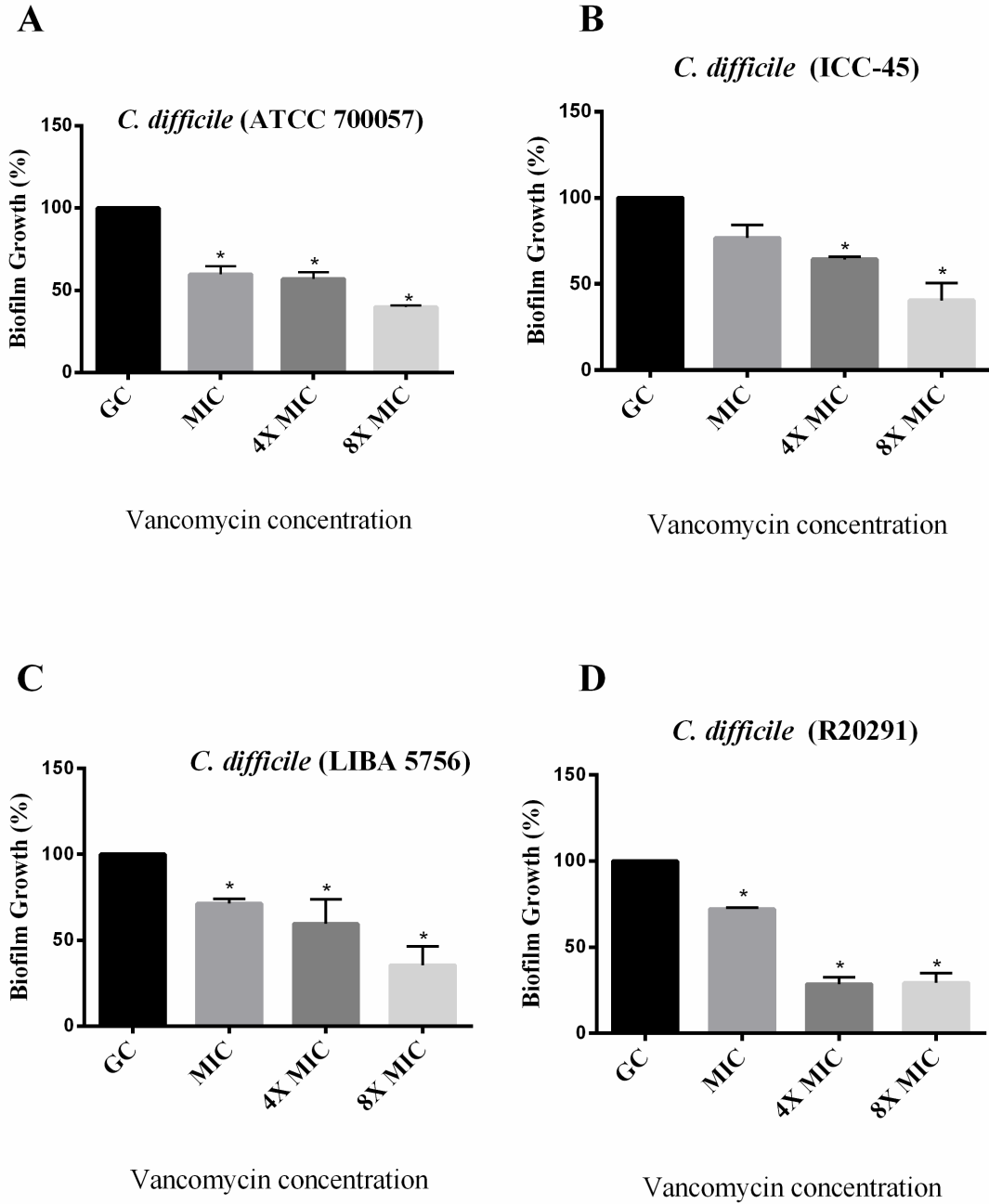
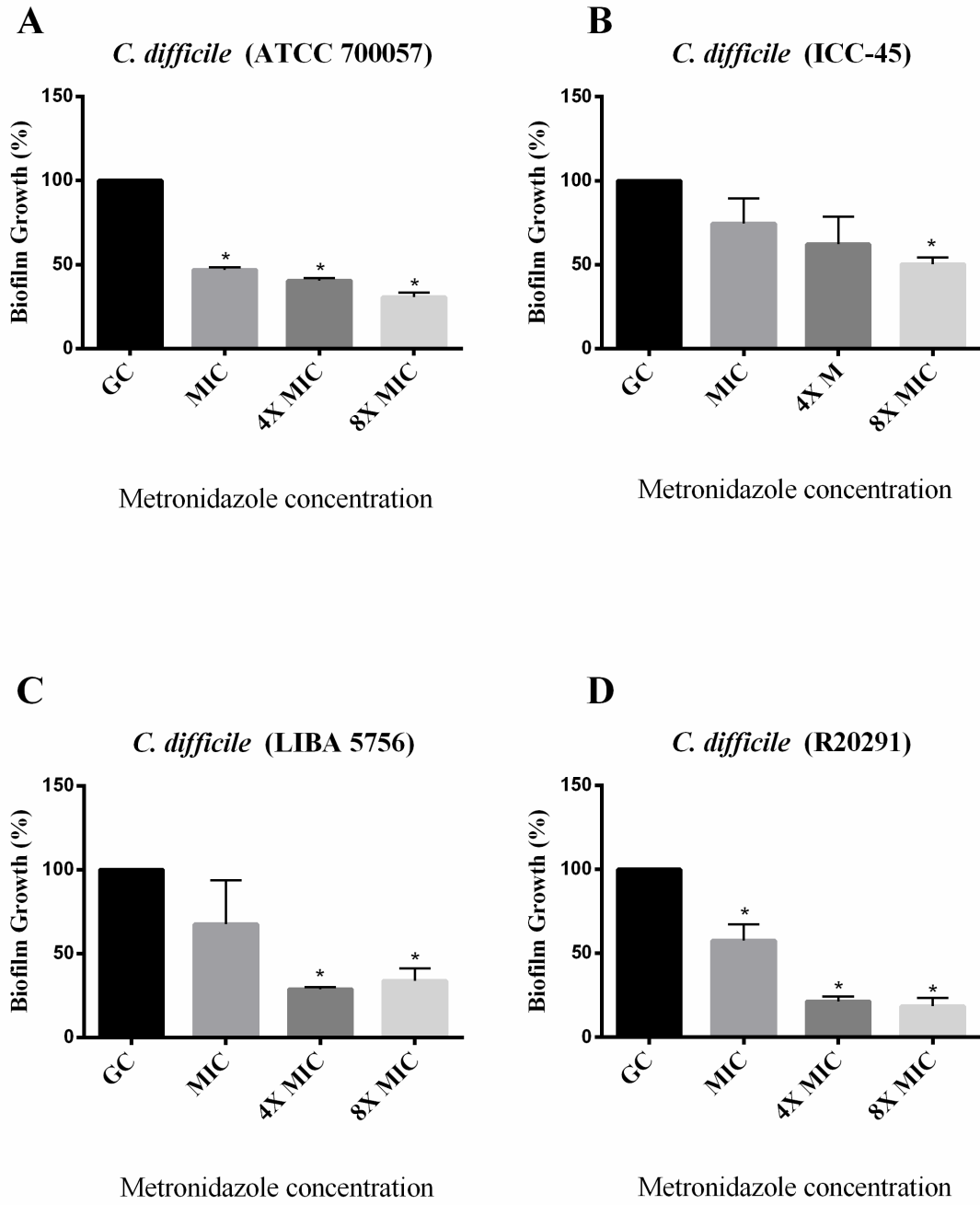


FIGURE 7



4 CONCLUSÃO GERAL

Apesar dos esforços que vem sendo realizados no estudo de biofilmes, existem poucas informações com relação a caracterização de biofilmes intestinais do *C. difficile*, uma melhor compreensão da formação de biofilmes por agentes patogênicos e de como os biofilmes contribuem para doenças pode resultar em melhora na prevenção e tratamento de doenças, como a CDI. No presente trabalho observamos que a cepa ICC-45 isolada no Ceará tem a capacidade de formar biofilmes, após 120h a formação deste biofilme é comparável à de uma cepa epidêmica. Foi observado que biofilme de *C. difficile* é um biofilme espesso, denso e bem-organizado. Em relação aos genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA* *slpA* e *spo0A*, sua expressão foi maior no ICC-45 do que nas cepas toxigênicas R20291 ou LIBA 5756. Além disso, quando tratados com os antibióticos MTZ e VAN, a biomassa do biofilme do ICC45 foi semelhante ao controle de crescimento. Finalmente, os dados obtidos podem ter implicações importantes para o tratamento e desenvolvimento de novas terapêuticas visando combater ou prevenir a CDI, no entanto, investigações adicionais das características do ICC-45 e dos sinais regulatórios que regem a formação de biofilme serão necessárias no futuro.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO, C. *et al.* Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 14, p. 3069–3073, 2015.
- AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; JANK, T. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) - A virulence factor disturbing the cytoskeleton. **Anaerobe**, v. 53, n. 1, p. 21–29, 2018.
- ALCIDES, A. P. P. *et al.* New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 53–59, 2007.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. *et al.* High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 358–361, 2013.
- ARATO, V. *et al.* Dual role of the colonization factor CD2831 in *Clostridium difficile* pathogenesis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- AWAD, M. M. *et al.* *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. **Gut Microbes Landes Bioscience**, v.3, 2015.
- BAGDASARIAN, N.; RAO, K.; MALANI, P. N. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: A systematic review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 4, p. 398–408, 2015.
- BAKKER, D. *et al.* TcdC does not significantly repress toxin expression in *Clostridium difficile* 6308Erm. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 17 ago. 2012.
- BALASSIANO, I. T. *et al.* Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, v. 15, n. 3, p. 61–64, jun. 2009.
- BALASSIANO, I. T. *et al.* *Clostridium difficile*: A problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 169–179, 2012.
- BARTLETT, J.G. The case for vancomycin as the preferred drug for treatment of *Clostridium difficile* infection. **Clin Infect Dis**, v.46, n.10, p. 1489-92, 2008.
- BAUER, M. P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 63–73, 2011.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, 2014.

- BELLA, S. DI *et al.* *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 2–25, 2016.
- BERLANGA, M.; GUERRERO, R. Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microbial Cell Factories**. v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BORRIELLO, S. P. *Clostridium difficile* and its toxin in the gastrointestinal tract in health and disease. **Research and Clinical Forums**, v. 1, p. 33–5, 1979.
- BORRIELLO, S.P.; WILCOX, M.H. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. **J Antimicrob Chemother**, v.1, p. 67-9, 1998.
- BRAUER, M. *et al.* What's a Biofilm? How the Choice of the Biofilm Model Impacts the Protein Inventory of *Clostridioides difficile*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 10 jun. 2021.
- BUCKLEY, A. M. *et al.* Infection of hamsters with the UK *clostridium difficile* ribotype 027 outbreak strain R20291. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1174–1180, ago. 2011.
- BRITO, G.A.; SULLIVAN, G.W.; CIESLA, W.P.; CARPER H.T.; MANDELL, G.L.; GUERRANT R.L. *Clostridium difficile* toxin A alters *in vitro*-adherent neutrophil morphology and function. **Journal of Infectious Diseases**. 185, 1297-1306, 2002a.
- BRITO, G.A.; FUJJI, J.; CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, A.A.M.; OBRIG R.; GUERRANT R.L. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **Journal of Infectious Diseases**. 186, 1438-1447, 2002b.
- BUFFIE, C. G. *et al.* Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. **Nature**, v. 517, n. 7533, p. 205–208, 2015.
- CAI, H. *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy Danshen can interact with intestinal bacteria from normal and chronic renal failure rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, n.8, p. 1758–1771, 2019.
- CASTRO, C. E. F.; MUNOZ-PRICE, L. S. Advances in Infection Control for *Clostridioides* (Formerly *Clostridium*) *difficile* Infection. p. 12–22, 2019.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. (Atlanta, GA, 2019)
- CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 723–750, 2017.
- CHEN, B. *et al.* Structure of the glucosyltransferase domain of TcdA in complex with RhoA provides insights into substrate recognition. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 7-15, 2022.
- CHOI, K. B. *et al.* Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection : an institutional costing analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 102, n. 2, p. 141–147, 2019.
- CLIFFORD MCDONALD, L. *et al.* An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium*

difficile **Journal of Medicine**, v. 353, n. 8, p. 2433–2441, 2005.

COLLINS, D. A.; HAWKEY, P. M.; RILEY, T. V. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, **BioMed Central**, v. 21, n. 2, p. 1–9, 2013.

COSTA, C. L. *et al.* A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe**, v. 40, p. 76–84, 2016.

COSTA, C. L. *et al.* Anaerobe Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. v. 48, p. 232–236, 2017.

COSTERTON, J.W. How bacteria stick. This Week's Citation Classic. **Current Contents**, v.48, p. 18, 1989.

COWARDIN, C. A. *et al.* The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 8, 11 jul. 2016.

CROWTHER, G. S.; WILCOX, M. H.; CHILTON, C. H. An *in vitro* model of the human colon: Studies of intestinal biofilms and *Clostridium difficile* infection. **Em: Methods in Molecular Biology**, v. 1476, p. 223–234, 2016.

CZEPIEL, J. *et al.* *Clostridium difficile* infection: A review. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 103–109, 2018.

DAPA, T.; UNNIKRIISHNAN, M. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. **Gut Microbes**, v. 4, n. 5, p. 397–402, 2013.

DAPA, T. *et al.* Multiple Factors Modulate Biofilm formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 545–555, 2013.

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society symposium**, v. 61, p. 1–31, 1995.

DAWSON, L. F. *et al.* Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

DEAKIN, L. J. *et al.* The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 8, p. 2704–2711, 2012.

DEGRUTTOLA, A. K. *et al.* Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, 1 maio 2016.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 8, p. 411–416, 2001.

DESHPANDE, A. *et al.* Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 36, n. 4, p.452-60, 2015.

- DI BELLA, S. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 2–25, 2016.
- DICANDIA, M. A. *et al.* Identification of functional Spo0A residues critical for sporulation in *Clostridioides difficile*. **bioRxiv**, v.4, n. 404, p. 7-15, 2022.
- DONELLI, G. *et al.* Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 318–325, 2012.
- DRUDY. *et al.* Flow cytometric analysis of *Clostridium difficile* adherence to human intestinal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, v.50, p. 526-534, 2001.
- EDWARDS, A. N. *et al.* Chemical and stress resistances of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1-13, 2016.
- ELGENDY, S. G. *et al.* Clinical and microbial characterization of toxigenic *Clostridium difficile* isolated from antibiotic associated diarrhea in Egypt. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 296–304, 2020.
- ELLIOTT, B. *et al.* The complexity and diversity of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* clade 5. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 12, p. 3159–3170, 2014.
- ENGEVIK, M. A. *et al.* Human *Clostridium difficile* infection: Altered mucus production and composition. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 308, n. 6, p. G510–G524, 2014.
- EVEILLARD, M. *et al.* Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT29 cells in culture. **Molecular Microbiology**. [s.l.: s.n.].
- EZE, P. *et al.* Risk factors for *Clostridium difficile* infections - An overview of the evidence base and challenges in data synthesis. **Journal of Global Health**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- FAGAN, R. P.; FAIRWEATHER, N. F. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. **Nature Reviews Microbiology**, mar. 2014.
- FANG, W. *et al.* *Clostridium difficile* carriage in hospitalized cancer patients: a prospective investigation in eastern China. p. 4–9, 2014.
- FARROW, M. A. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B-induced necrosis is mediated by the host epithelial cell NADPH oxidase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 46, p. 18674–18679, 12 nov. 2013.
- FILIPPO, C. DE *et al.* Gut microbiota in children and altered profiles in juvenile idiopathic arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 98, n. January, p. 1–12, 2019.
- FINNEY, J.M.T. Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. **Bull Johns Hopkins Hosp**, v.4, p.53-7, 1893.
- FIMLAID, K. A. *et al.* Regulation of *Clostridium difficile* Spore Formation by the SpoIIQ and

SpoIIIA Proteins. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 10, 2015.

FLEMMING, H. C. *et al.* Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FREEMAN, J. *et al.* The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clinical Microbiology Reviews. **American Society for Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 529–529, 2010.

GAREY, K. W. *et al.* Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 4, p. 298–304, 2008.

GEORGE, R.H. *et al.* Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. **British Medical Journal**, v.1, p. 695-701, 1978.

GEORGE, W. L.; SUTTER, V. L.; CITRON, D. Selective and differential medium for isolation of Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 214–219, 1979.

GERDING, D. N. *et al.* Clostridium difficile binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 15–27, 31 out. 2013.

GIRÃO, S. E. *et al.* Predictive factors, outcomes, and molecular epidemiology of Clostridioides difficile diarrhea in Brazilian hospitals European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 40, p.1821–1832, 2021.

GHANTOJI, S. S. *et al.* Economic healthcare costs of *Clostridium difficile* infection: A systematic review. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 4, p. 309–318, 2010.

GOORHUIS, A. *et al.* Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1162–1170, 2008.

GOUDARZI, M. *et al.* *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. **Scientifica**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

GOVIND, R.; DUPUY, B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein tcdE. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. 1-14, 2012.

GREGORY, A. L.; PENSINGER, D. A.; HRYCKOWIAN, A. J. A short chain fatty acid-centric view of *Clostridioides difficile* pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 10, p. 1-15, 2021.

GUPTA, P. *et al.* Biofilm, pathogenesis, and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants. **American Journal of Diseases of Children**, v. 49, p. 390–402, 1935.

HAMADA, M. *et al.* Inhibitory effect of fidaxomicin on biofilm formation in Clostridioides difficile. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 7, p. 685–692, 2020.

HERNANDEZ, B. G. *et al.* Prevalence, Colonization, Epidemiology, and Public Health Significance of *Clostridioides difficile* in Companion Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2020.

HODGE, R. G.; RIDLEY, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 496–510, 2016.

HOIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017.

IMWATTANA, K. *et al.* *Clostridium difficile* ribotype 017—characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia. **Emerging Microbes and Infections** v. 8, n. 1, p. 796–807, 2019.

JAIN, S. *et al.* Inactivation of the *dnaK* gene in *Clostridium difficile* 630 Δ erm yields a temperature-sensitive phenotype and increases biofilm-forming ability. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

JAMES, G. A. *et al.* Analysis of *Clostridium difficile* biofilms: Imaging and antimicrobial treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 102–108, 2018.

JAMROSKOVIC, J. *et al.* Variability in DPA and calcium content in the spores of *Clostridium* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n.11, p. 1–11, 2016.

JANOIR, C. *et al.* Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 20, p. 7174–7180, 2007.

JIN, D. *et al.* Molecular epidemiology of clostridium difficile infection in hospitalized patients in eastern China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 801–810, 2017.

KACHRIMANIDOU, M.; TZIKA, E.; FILIOUSSIS, G. Clostridioides (*Clostridium*) difficile in food-producing animals, horses and household pets: A comprehensive review. **Microorganisms**, v. 7 n. 12, p. 1–19, 2019.

KARYGIANNI, L. *et al.* Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668–681, 2020.

KATO, H. *et al.* Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1391–1395, 2001.

KIRBY, J. M. *et al.* Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34666–34673, 2009.

KOCHAN, T. J. *et al.* Germinant Synergy Facilitates *Clostridium difficile* Spore Germination under Physiological Conditions. **mSphere**, v. 3, n. 5, 2018.

LARSON, H.E. *et al.* *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. **Lancet**, v.1, p. 1063-6, 1978.

LAWLER, A. J.; LAMBERT, P. A.; WORTHINGTON, T. A Revised Understanding of *Clostridioides difficile* Spore Germination. Trends in Microbiology. **Elsevier Ltd**, v.28, n. 9, p. 744-752, 2020.

LAWLEY, T. D. *et al.* Use of purified clostridium difficile spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 20, p. 6895–6900, 2010.

LAWSON, P. A. *et al.* Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95–99, 1 ago. 2016.

LIN, H. J. *et al.* Risk factors for *Clostridium difficile* -associated diarrhea among hospitalized adults with fecal toxigenic C. difficile colonization. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 2, p. 183–189, 2015.

MACCANNELL, D. R. *et al.* Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2147–2152, jun. 2006.

MALDARELLI, G. A. *et al.* Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 6, p. 1–10, 2016.

MARSH, J. W. *et al.* Association of relapse of *Clostridium difficile* disease with BI/NAP1/027. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4078–4082, 2012.

MARUJO, V.; ARVAND, M. The largely unnoticed spread of *Clostridioides difficile* PCR ribotype 027 in Germany after 2010. **Infection Prevention in Practice**, v. 2 n. 4, p. 1–8, 2020.

MATHUR, H. *et al.* The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against *Clostridium difficile* biofilms and planktonic cells. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2016.

MERRIGAN, M. M. *et al.* Surface-Layer Protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

MOTTA, J. P. *et al.* Gastrointestinal biofilms in health and disease. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. **Nature Research**, v. 18, n. 5, p. 314–334, 2021.

NAABER, P. *et al.* Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. **FEMS. Immunology and Medical Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 205–209, 1996.

NEEMANN, K.; FREIFELD, A. Clostridium difficile – Associated Diarrhea in the Oncology Patient. v. 13, n. 1, p. 25–31, 2017.

NORMINGTON, C. *et al.* Biofilms harbour Clostridioides difficile, serving as a reservoir for

recurrent infection. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, p.1-10, 2021.

NOTERMANS, D. W. *et al.* Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. **Lancet**, v. 377, p. 63–73, 2011.

OATLEY, P. *et al.* Spatial organization of Clostridium difficile S-layer biogenesis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

O'CONNOR, J.R.; JOHNSON, S., GERDING, D.N. Clostridium difficile infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 1913-24, 2009.

OLSEN, M. A. *et al.* Recurrent Clostridium difficile infection is associated with increased mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 2, p. 164–170, 2015.

PANTALÉON, V. *et al.* Biofilms of Clostridium species. **Anaerobe**, v. 30, p. 193–198, 2014.

PANTALÉON, V. *et al.* The Clostridium difficile Protease Cwp84 Modulates both Biofilm Formation and Cell- Surface Properties. **PLoS One**, v. 10, p. 1–20, 2015.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. Clostridium difficile spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 7, p. 406–416, 2014.

PASSMORE, I. J. *et al.* Para-cresol production by Clostridium difficile affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1-31, 2018.

PÉCHINÉ, S.; DENÈVE-LARRAZET, C.; COLLIGNON, A. Clostridium difficile adhesins. Em: **Methods in Molecular Biology**, v. 1476, n. 1, p. 91-101, 2016.

PENA, R. T. *et al.* Relationship between quorum sensing and secretion systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 1476, n. 1, p. 1-14, 2019.

PENG, Z. *et al.* Update on antimicrobial resistance in Clostridium difficile: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 1998-2008, 2017.

PHUYAL, S.; FARHAN, H. Sinalização Rho GTPase Multifacetada nas Endomembranas. **Frontiers in Cell and Developmental**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2019.

PIEPENBRINK, K. H. *et al.* Structural and evolutionary analyses show unique stabilization strategies in the type IV Pili of Clostridium difficile. **Structure**, v. 23, n. 2, p. 385–396, 2015.

PIOTROWSKI, M. *et al.* Fructooligosaccharides and mannose affect Clostridium difficile adhesion and biofilm formation in a concentration-dependent manner. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, n. 10, p. 1975–1984, 2019.

PLAZA-GARRIDO *et al.* Predominance of Clostridium difficile ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, 2012. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 5, p. 976–979, 2016.

POQUET, I. *et al.* *Clostridium difficile* Biofilm: Remodeling metabolism and cell surface to build a sparse and heterogeneously aggregated architecture. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–20, 2018.

PRUITT, R. N.; LACY, D. B. Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2012.

QUESADA-GÓMEZ, C. *et al.* Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 669–670, 2010.

RAHMOUN, L. A.; AZRAD, M.; PERETZ, A. Antibiotic Resistance and Biofilm Production Capacity in *Clostridioides difficile*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1-10, 2021.

RANSOM, E. M. *et al.* Multiple factors contribute to bimodal toxin gene expression in *Clostridioides (Clostridium) difficile*. **Molecular Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 533–549, 1 nov. 2018.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2019.

RODRIGUEZ, C. *et al.* *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 59–78, 2016.

RODRIGUEZ DIAZ, C.; SEYBOLDT, C.; RUPNIK, M. Non-human *C. difficile* reservoirs and sources: Animals, food, environment. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1050, p. 227–243, 2018.

ROMERO-RODRÍGUEZ, A. *et al.* The *Clostridioides difficile* Cysteine-Rich Exosporium Morphogenetic Protein, CdeC, Exhibits Self-Assembly Properties That Lead to Organized Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. **Mosphere**, v. 5, n. 6, p. 1-19, 2020.

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.

SCHWAN, C. *et al.* *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. 1-8, 2009.

SCHWANBECK, J. *et al.* *Clostridioides difficile* Single Cell Swimming Strategy: A Novel Motility Pattern Regulated by Viscoelastic Properties of the Environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2021.

SEKULOVIC, O. *et al.* The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV confers phase-variable phage resistance. **Molecular Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 329–342, 2015.

SEMENYUK, E. G. *et al.* Analysis of bacterial communities during *C. difficile* infection in the mouse. **Infection and Immunity**, v. 83, p.4383-4391, 2015.

- SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2019.
- SIMPSON, H. L. et al. Soluble Non-Starch Polysaccharides from Plantain (*Musa x paradisiaca* L.) Diminish Epithelial Impact of *Clostridioides difficile*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1-20, 2021.
- SJÖBERG, M. et al. Transmission of *Clostridium difficile* spores in isolation room environments and through hospital beds. **APMIS**, v. 122, n. 9, p. 800–803, 2014.
- SOAVELOMANDROSO, A. P. et al. Biofilm structures in a mono-associated mouse model of *Clostridium difficile* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2017.
- SONG, J. H.; KIM, Y. S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: Risk factors, treatment, and prevention. **Gut and Liver**, v. 13, n. 1, p. 16–24, 2019.
- STIEGLITZ, F.; GERHARD, R.; PICH, A. The Binary Toxin of *Clostridioides difficile* Alters the Proteome and Phosphoproteome of HEp-2 Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-9, 2021.
- TAGGART, M. G. et al. Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: Novel systems linked to hypervirulence. PLoS Pathogens. **Public Library of Science**, v. 17, n. 9, p. 1–20, 2021.
- TAMEZ-TORRES, K. M. et al. Impact of *Clostridium difficile* infection caused by the NAP1/RT027 strain on severity and recurrence during an outbreak and transition to endemicity in a Mexican tertiary care center. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 65, p. 44–49, 2017.
- TASTEYRE, A. et al. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7937–7940, 2001.
- TEDESCO, F.J.; BARTON, R.W.; ALPERS, D. H. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. **Ann Intern Med**, v.81, p.429–33, 1974.
- TRINDADE, C. N. R.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, E. O. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. **Anaerobe**, v. 58, p. 13–21, 2019.
- VARDAKAS, K. Z. et al. Risk factors for development of *Clostridium difficile* infection due to BI/NAP1/027 strain: A meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 768–773, 2012.
- VESTBY, L. K. et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 1–29, 2020.
- VUOTTO, C. et al. Subinhibitory concentrations of metronidazole increase biofilm formation in *Clostridium difficile* strains. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 2, p. 97-115, 2016.

WANG, P. W. *et al.* Opportunities for nanomedicine in *Clostridioides difficile* infection. *Antibiotics*. **MDPI AG**, v. 10, n. 8, p. 1–17, 2021.

WARNY, M. *et al.* Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1079–1084, 2005.

WETZEL, D.; MCBRIDE, S. M. The impact of pH on *Clostridioides difficile* sporulation and physiology, v. 3, n. 86, p. 19–26, 2020.

WULTAŃSKA, D.; PIOTROWSKI, M.; PITUCH, H. The effect of berberine chloride and/or its combination with vancomycin on the growth, biofilm formation, and motility of *Clostridioides difficile*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 7, p. 1391–1399, 2020.

YIN, W. Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 1–18, 2019.

YOUNG, M. K. *et al.* Binary Toxin Expression by *Clostridioides difficile* Is Associated with Worse Disease. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1-5, 2022.

ZHU, D.; SORG, J. A.; SUN, X. *Clostridioides difficile* biology: Sporulation, germination, and corresponding therapies for C. difficile infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.