



DEPARTAMENTO DE
MICROBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ecologia e Fatores de Virulência

C. perfringens e *C. difficile*

Dra. Viviane Nakano
Centro Diagnóstico Molecular - SZD
Laboratório de Anaeróbios – ICB II
E-mail: vivinkn@usp.br

Gênero *Clostridium*

* Taxonomia

- Os três grupos de clostrídios que compõem 70% da microbiota intestinal são:
 - Cluster I: *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. limosum*, *C. baratii* (*C. botulinum* e *C. tetani*).
 - Cluster XIVa: *C. coccoide*, *C. clostridioforme*, *C. sphenoides*.
 - Cluster XI: *C. difficile*, *C. glycolicum*, *C. bifermentans*.

(Collins et al., 1994)

Gênero *Clostridium*

* Taxonomia

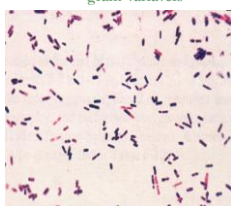
- Atualmente mais de 150 espécies de *Clostridium* já foram descritas, entretanto as espécies de importância clínica humana e animal são relativamente pequena.
- Novas espécies identificadas no trato intestinal: *C. disporicum*, *C. hiranonis*, *C. hylemonae*, *C. methylpentosum*, *C. orbiscindens* e *C. scindens*.

(Finegold et al., 2002)

Gênero *Clostridium*

* Características gerais

- Bacilos retos ou curvos, mas podem apresentar a forma de coco-bacilos ou formar filamentos (pleomórficos).
- A maioria das espécies apresentam-se gram-positivas, mas algumas espécies são gram-variáveis (*C. ramosum*, *C. clostridioforme* e *C. tetani*).



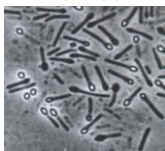
gram-variáveis

Gênero *Clostridium*

* Características gerais


- Esporulados (terminais, sub-terminais e centrais);
- Anaeróbios estritos ou aerotolerantes;
- Não reduzem sulfato.

Terminais




C. tetani

Sub-terminais



C. difficile

Centrais

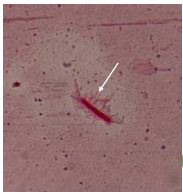


C. butyricum

Gênero *Clostridium*

* Características gerais

- Algumas espécies são móveis com flagelo peritriquo, entretanto existem espécies imóveis (*C. perfringens*, *C. ramosum* e *C. innocuum*);
- Raramente produzem catalase ou apresentam fraca reação;
- São sacarolíticos e/ou proteolíticos;
- Poucas espécies são encapsuladas.



Flagelo peritriquo

Gênero *Clostridium*



*Ecologia

- São espécies ubíquas na natureza, seu principal habitat são o solo e trato intestinal de humanos e animais .
- As espécies de clostrídios são frequentemente isolados de fezes de humanos durante as primeiras semanas de vida, entretanto as crianças amamentadas com leite materno são menos colonizadas do que aquelas que são alimentadas com leites artificiais.

Gênero *Clostridium*

*Ecologia

C. sordellii, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. subterminale* e *C. perfringens*, *C. botulinum* e *C. tetani*.



C. perfringens, *C. difficile*, *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. tertium* e *C. butyricum*.

Gênero *Clostridium*

*Infecções endógenas

São agrupadas em três categorias:

- Não Invasiva: toxina é responsável pelos sintomas;
- Invasiva (histotóxica): infecção progressiva e destruição do tecido;
- Purulenta: infecção mista, envolve vários órgãos, usualmente a cavidade peritoneal.

Gênero *Clostridium*

*Infecções endógenas

- Grupo I - espécies que causam mionecrose: *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* (tipoA), *C. bifermentans*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*.
- Grupo II – tétano: *C. tetani*.
- Grupo III – botulismo: *C. botulinum*.

Gênero *Clostridium*

*Infecções endógenas

- Grupo IV – diarreia associada aos antimicrobianos e colite pseudomembranosa: *C. difficile*.
- Grupo V – abscesso cerebral, infecções intra abdominais e ginecológicas, pneumonia e bacteremia: *C. ramosum*, *C. bifermentans* entre outros.

Espécies de importância clínica

Clostridium perfringens
Clostridium difficile
Clostridium tetani
Clostridium botulinum
Clostridium septicum
Clostridium ramosum
Clostridium butyricum
Clostridium tertium

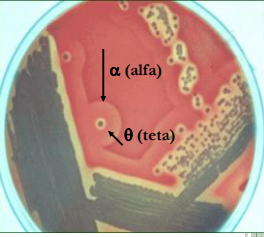
Clostridium bifermentans
Clostridium baratii
Clostridium clostridioforme
Clostridium sordellii
Clostridium novyi
Clostridium histolyticum
Clostridium sporogenes
Clostridium subterminale

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens

*** Características gerais**

- Conhecido também como *C. welchii*.
- Bacilos esporulados gram-positivo não-móveis. Podem crescer entre 15 a 50°C.
- Ágar sangue - dupla camada de hemólise - uma zona clara interna (teta-toxina) e zona externa (alfa-toxina).



Clostridium perfringens

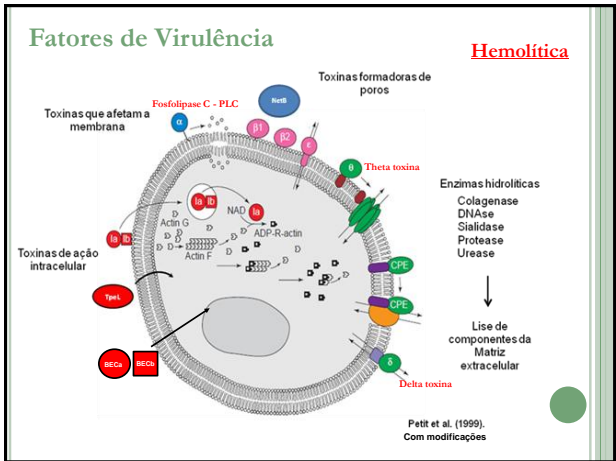
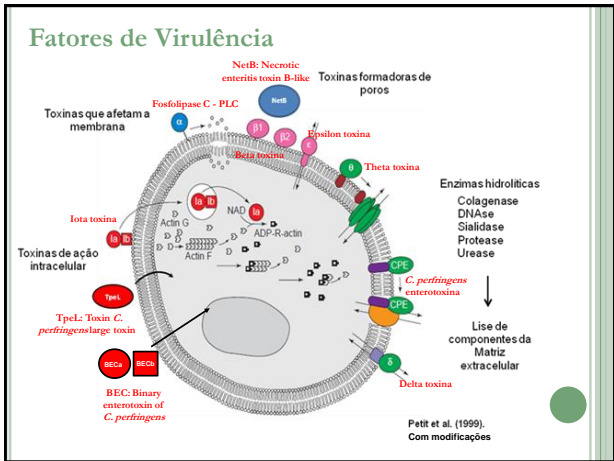
***Fatores de virulência**

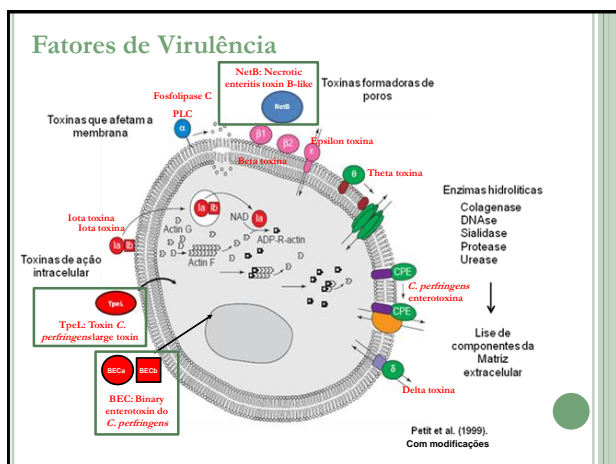
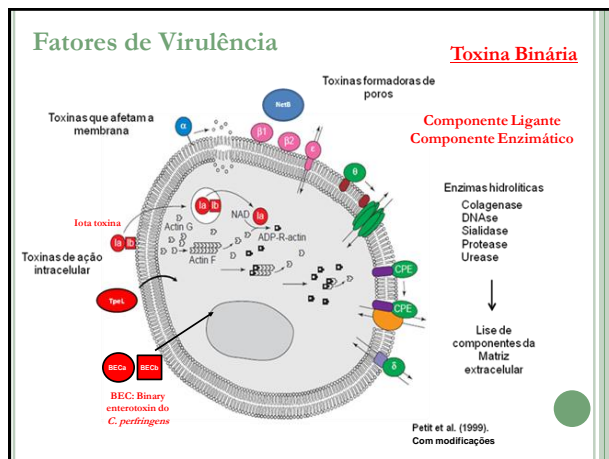
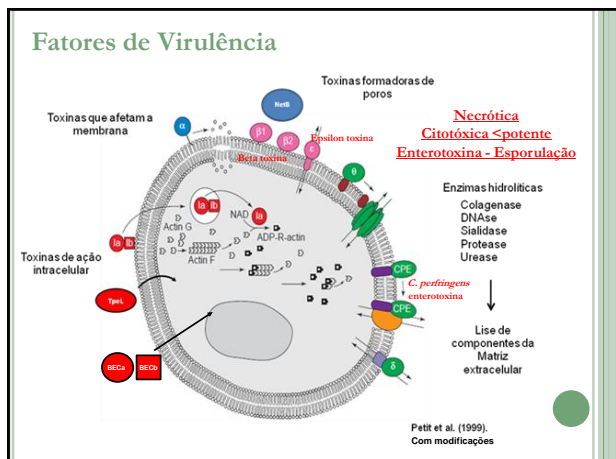
C. perfringens pode produzir até 17 diferentes tipos de toxinas. As 5 mais letais toxinas são utilizadas para toxinotipar os isolados de (A-E).

Introdução

***Fatores de virulência - Toxinotipos**

Tipo	α-toxina (alfa)	β-toxina (beta)	ε-toxina (épsilon)	ι-toxina (iota)
A	+			
B	+	+		
C	+	+		
D	+		+	
E	+			+
Gene	<i>cpa</i>	<i>cpb1/cpb2</i>	<i>etx</i>	<i>iap/ibp</i>
Localização	cromossomo	plasmidio	plasmidio	plasmidio





Microbiology (2007), 153, 1198–1206 DOI: 10.1099/mic/02006/002287-0

A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C

Katsuhiko Amimoto, Taichi Noro, Eiji Oishi and Mitsugu Shimizu
 Kyoto Biken Laboratories, Inc., 24-16 Makishima-cho, Uji, Kyoto 611-0041, Japan

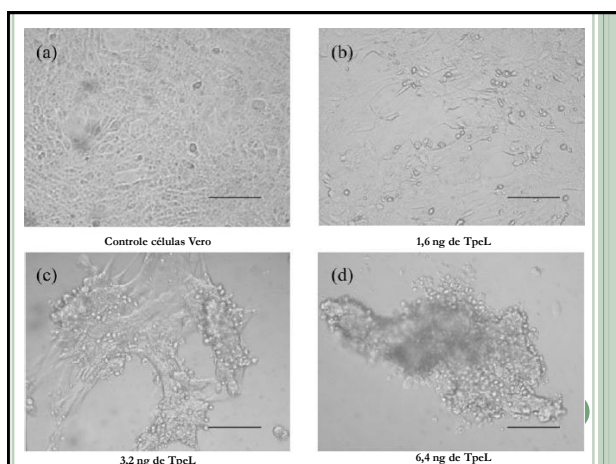
Correspondence
 Katsuhiko Amimoto

Tipo C – origem suína

Produzida - esporulação

LCT (large clostridial cytotoxin) – *C. difficile*, *C. sordelli*, *C. novy*.

(Ashimoto et al., 2007)



OPEN ACCESS Freely available online PLOS PATHOGENS

NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*

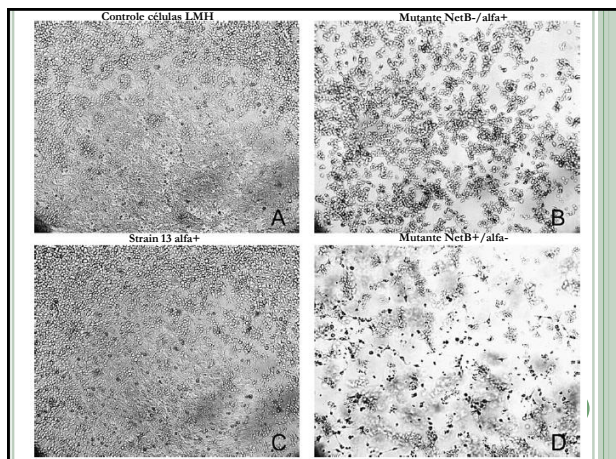
Anthony L. Keyburn^{1,2,3}, John D. Boyce², Paola Vaz², Trudi L. Bannam², Mark E. Ford¹, Dane Parker², Antonio Di Rubbo¹, Julian I. Rood^{2,3}, Robert J. Moore^{1,2,3*}

¹ CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory, Geelong, Victoria, Australia, ² Department of Microbiology, ARC Centre of Excellence in Structural and Functional Microbial Genomics, Monash University, Clayton, Victoria, Australia, ³ Australian Poultry Cooperative Research Centre, Armidale, New South Wales, Australia

Tipo A – enterite necrótica aviária

Possui semelhanças com a Beta-toxina

(Keyburn et al., 2008)



IAI
Journal of Microbiology

BEC, a Novel Enterotoxin of *Clostridium perfringens* Found in Human Clinical Isolates from Acute Gastroenteritis Outbreaks

Shinya Yonogi,¹ Shigeaki Matsuda,² Takao Kawai,³ Tomoko Yoda,³ Tetsuya Harada,⁴ Yuko Kumeda,⁵ Kazuyoshi Gotoh,⁶ Hirotsuka Hiyoshi,² Shota Nakamura,^{6,4} Toshio Kodama,⁴ Tetsuya Iida^{2,5,6}

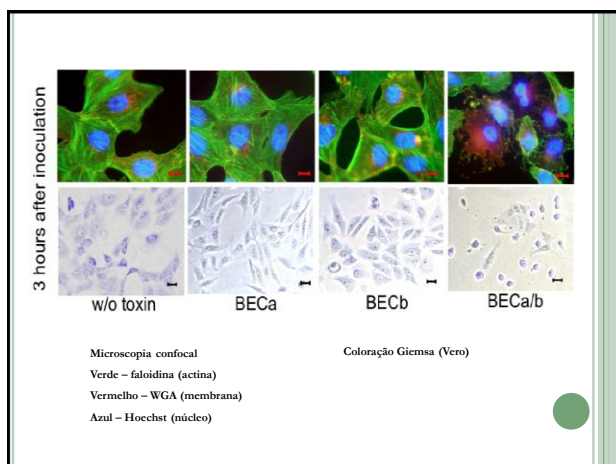
Division of Bacteriology, Department of Infectious Disease, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Osaka, Japan¹; Laboratory of Genomic Research on Pathogenic Bacteria² and Pathogenic Microbes Repository Unit³; International Research Center for Infectious Diseases, and Department of Infection Metagenomics⁴ and Department of Genome Informatics,⁵ Genome Information Research Center, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Tipo A – gastroenterite humana

Produzida - esporulação

2 cepas identificadas surto – Japão (591 casos analisados)

(Yonogi et al., 2014)



Clostridium perfringens

*Importância clínica

Tipo A

Mionecrose (Gangrena gasosa) – humanos

Intoxicação alimentar – humanos

Enterite necrótica – aves e porcos

Enterotoxemia – carneiros e bois

Colites – equinos

Gastroenterite hemorrágica – cães

Clostridium perfringens

*Importância clínica – cepas Tipo A

Mionecrose

- Acomete apenas humanos e a doença se desenvolve devido a entrada de células vegetativas ou esporos nas cavidades do corpo via trauma ou feridas cirúrgicas.

Clostridium perfringens

Mionecrose

- Está associada com a produção de duas toxinas (alfa e theta), mas a α -toxina ou fosfolipase C-PLC (potente toxina extracelular) tem um papel fundamental no desenvolvimento da patologia.

Clostridium perfringens Mionecrose – Gangrena Gasosa

- Infecção aguda,
- Febre, edema local
- Formação de bolhas

Caso não seja tratada pode acarretar:

- Toxemia sistêmica
- Hipotensão, choque
- Falência múltipla de órgãos e óbito



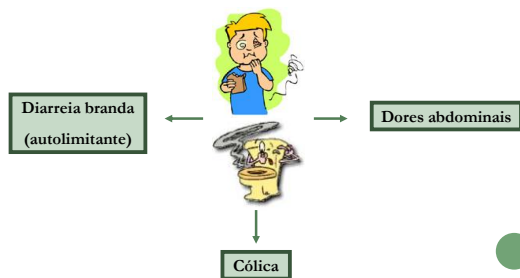
Clostridium perfringens

*Importância clínica – cepas Tipo A Intoxicação alimentar

- Está associada com a produção da CPE;
- Sintomas são iniciados após 8-16 h do consumo de alimentos contaminados ($\uparrow 10^6$ UFC/g) normalmente a base produto animal;
- A doença é auto limitante persistindo até 12-24 h depois do início dos sintomas;
- Casos mais graves são observados em idosos e desidratados.

Clostridium perfringens

Intoxicação alimentar



Clostridium perfringens

*Importância clínica – cepas Tipo A Enterite necrótica em animais

- Diarreia não hemorrágica
- Necrose
- Serosite
- Lesões mais severas acometem o jejuno e íleo



(Songer et al., 2005)

Clostridium perfringens

*Fatores críticos para desenvolvimento



Shojadoost et al. (2012).

Clostridium perfringens

*Importância clínica – cepas Tipo A Enterite necrótica em frangos



(Keyburn et al., 2010)

Clostridium perfringens

*Importância clínica

Não causa patologia em humanos

Tipo B

Disenteria - carneiros (recém-nascidos)
Enterite crônica – carneiros
Enterite hemorrágica – bezerros e potros
Enterotoxemia hemorrágica – ovelhas

Clostridium perfringens

*Importância clínica

Tipo C

Enterite necrótica (Pig-Bel) – humanos (rara)
Enterite necrótica – aves
Enterotoxemia necrótica ou hemorrágica – porcos, carneiros, potros, cabras
Enterotoxemia aguda – carneiros adultos

Clostridium perfringens

*Importância clínica – cepas Tipo C

Enterite necrótica – “Pigbel”

- Descrita pela primeira vez na Nova Guiné em meados dos anos 60s;
- Enterite caracterizada por necrose do jejuno e está associada a alta mortalidade se não diagnosticada rapidamente e tratada com antibioticoterapia.

Clostridium perfringens

Enterite necrótica – “Pigbel”

Fatores associados ao desenvolvimento da doença:

Aumento da ingestão de proteína animal (porco), o qual distende e obstrui o intestino

Nutrição pobre, onde produz baixas quantidades de proteases pancreáticas (particularmente tripsina que destrói a β -toxina)

Dieta rica em inibidores de tripsina (batata doce, amendoim e soja)

Inibidores de tripsina produzido por *Ascaris lumbricoides*

Clostridium perfringens

*Importância clínica – cepas Tipo C

Enterite necrótica – “Pigbel”

- Poucos casos tem sido observados em países desenvolvidos - casos vistos estão associados a ingestão de intestino de porco mal cozido ou pessoas com doenças crônicas (diabetes ou doenças hepáticas relacionadas com o consumo de álcool).

Clostridium perfringens

Enterite necrótica – “Pigbel”

- Dor abdominal
- Distensão e vômito
- Diarreia com sangue
- Necrose

Em alguns casos é necessária a retirada da porção necrosada para o tratamento definitivo



(Gui et al., 2002)

Clostridium perfringens

***Importância clínica**

Não causa patologia em humanos

Tipo D

Enterotoxemia – carneiros, bezerras e bois

Enterocolite – cabras

Clostridium perfringens

***Importância clínica**

Não causa patologia em humanos

Tipo E

Enterotoxemia – bezerras e carneiros

Enterites – coelhos

Curr Microbiol (2015) 70:330-337
DOI: 10.1007/s00284-014-0722-5

Sialidase Production and Genetic Diversity in *Clostridium perfringens* Type A Isolated from Chicken with Necrotic Enteritis in Brazil

Luis A. Llanco · Viviane Nakano · Mario J. Avila-Campos

22 cepas Tipo A - frangos com enterite necrótica

TpeL, NetB, Neuraminidase, Susceptibilidade aos antimicrobianos e Diversidade Genética

Isolates	Toxinotype	Neuraminidase (Tter)	Genes		Resistance profile	Genetic groups
			nanI	nanJ		
1a	A, tpeL(-)	2	+	+	B, CF, CL, ER, O, S, T	I
1b	A, tpeL(-)	2	+	+	CF, CL, ER, O, S, T	I
3c	A, tpeL(+)	8	+	+	B, CF, CL, ER, S	I
1d	A, tpeL(-)	0	-	-	CF, CL, ER, S	II
5a	A, tpeL(-)	16	+	+	CF, ER, S, T	II
8c	A, tpeL(-)	32	+	+	CF, ER, S	II
2a	A, tpeL(-)	16	+	+	CF, ER, S	II
6a	A, tpeL(-)	8	+	+	B, CF, ER, S	III
0b	A, tpeL(+)	4	+	+	B, CF, ER, S	III
6c	A, tpeL(+)	8	+	+	B, CF, ER, S	III
6d	A, tpeL(+)	16	+	+	B, CF, ER, S	III
8a	A, tpeL(-)	16	+	+	CF, ER, S	III
Cp	A, tpeL(-)	4	+	+	CF, CL, S	III
8b	A, tpeL(-)	16	+	+	CF, ER, S, T	III
8d	A, tpeL(-)	8	+	+	CF, ER, S	III
4a	A, tpeL(+)	4	+	+	CF, CL, ER, O, S, T	IV
9a	A, tpeL(-)	4	+	-	CF, CL, S	IV
9b	A, tpeL(+)	4	+	-	CF, ER, S, T	IV
7a	A, tpeL(-)	2	+	-	B, CL, S	V
3a	A, tpeL(-)	0	+	+	B, CF, CL, ER, S	VI
3b	A, tpeL(-)	0	+	+	B, CF, ER, O, S	VI
3d	A, tpeL(+)	8	+	+	B, CF, ER, O, S	VI
1c	A, tpeL(-)	16	+	+	B, CF, CL, ER, S	VII

7 cepas TpeL+ (31,8%)

(Llanco et al., 2015)

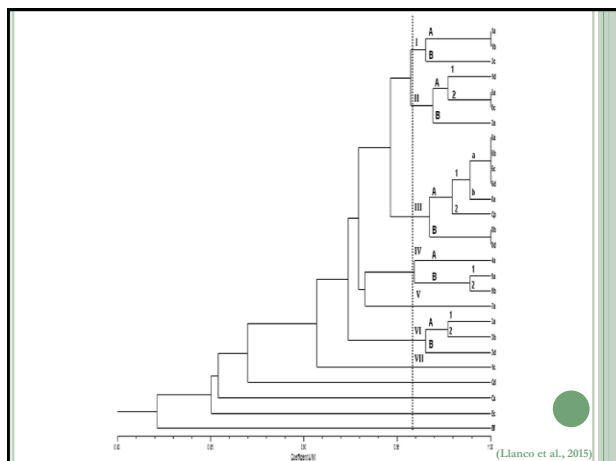


Table 3 Genetic patterns of *Clostridium perfringens* from chicken with necrotic enteritis

Isolates	Sialidase production	Presence of genes		Common resistance to antimicrobials	Patterns
		nanI	nanJ		
1a, 1b, 3c, 5a, 8c, 2a, 6a, 6b, 6c, 6d, 8a, 8b, 8d, 4a, 3d, 1c	+	+	+	Cx, Er, S	I
1d	-	-	-	Cx, Cl, Er, S	II
9a, 9b, 7a	+	+	+	S	III
3a, 3b	-	+	+	B, Cx, Er, S	IV

B bacitracin; Cx cephalosin; Cl clindamycin; Er erythromycin; S sulphaquinoxalin

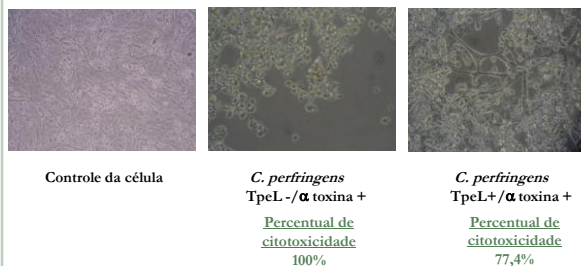
(Llanco et al., 2015)

Toxina TpeL

- Das 22 cepas *cpa* (α -toxina) Tipo A, 7 delas foram positivas para a toxina TpeL.
- **PCR do gene TpeL:** (Ashimoto et al., 2006)
- **Ensaio citotóxico em células Vero e HEP-2:** (Rocha et al., 2012)
- **Dosagem da citotoxicidade - VCA:** (Gentry and Dalrymple, 1980)
- **Adesão e invasão em células HEP-2 e Vero:** (Nakano et al., 2006)

(Llanco et al., 2014)

Ensaio citotóxico em células Vero



Controle da célula

C. perfringens
TpeL - / α toxina +*C. perfringens*
TpeL+ / α toxina +Percentual de
citotoxicidade
100%Percentual de
citotoxicidade
77,4%

(Llanco et al., 2014)

Ensaio citotóxico em células HEP-2



Controle da célula

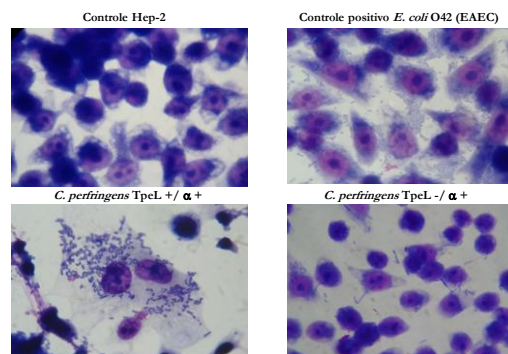
C. perfringens
TpeL - / α toxina +*C. perfringens*
TpeL+ / α toxina +Percentual de
citotoxicidade
100%Percentual de
citotoxicidade
59%

(Llanco et al., 2014)

Adesão em células HEP-2 (6 horas)

(Llanco et al., 2014)

Todas as cepas aderiram HEP-2



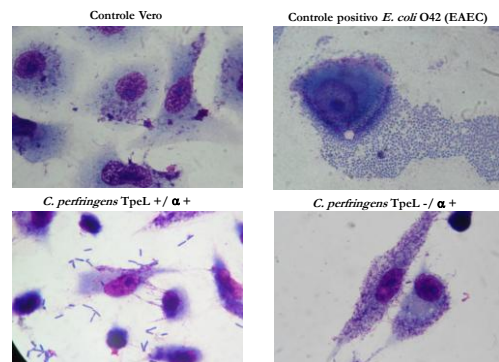
Controle Hep-2

Controle positivo *E. coli* O42 (EAEC)*C. perfringens* TpeL+ / α +*C. perfringens* TpeL- / α +

Adesão em células Vero (6 horas)

(Llanco et al., 2014)

6 das 7 cepas aderiram Vero



Controle Vero

Controle positivo *E. coli* O42 (EAEC)*C. perfringens* TpeL+ / α +*C. perfringens* TpeL- / α +

Cepas (TpeL/ α -toxina)	HEP-2 UFC/mL	Vero UFC/mL
<i>E. coli</i> O143	12,56 x 10 ³	0,02 x 10 ³
<i>C. perfringens</i> 18b (+/+)	Ø	Ø
<i>C. perfringens</i> 38c (+/+)	0,03 x 10 ³	0,01 x 10 ³
<i>C. perfringens</i> 47d (+/+)	0,1 x 10 ³	0,03 x 10 ³
<i>C. perfringens</i> 47c (+/+)	Ø	Ø
<i>C. perfringens</i> 269 1G (-/+)	0,03 x 10 ³	0,02 x 10 ³
<i>C. perfringens</i> 47e (+/+)	0,13 x 10 ³	Ø
<i>C. perfringens</i> 5Fb (-/+)	Ø	Ø
<i>C. perfringens</i> 38d (+/+)	1,58 x 10 ³	0,42 x 10 ³
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 (-/+)	0,75 x 10 ³	0,65 x 10 ³

Invasão em células HEP-2 e Vero

(Llanco et al., 2014)

• *C. perfringens* humanos (microbiota)

Tabela 7. Frequência relativa das espécies de *Clostridium* isoladas entre os grupos.

Espécies	Grupos					
	Eutróficos		Sobrepeso		Obesos	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>C. perfringens</i>	19	41,3	14	29,2	24	40,7
<i>C. clostridioforme</i>	3	6,5	2	4,2	5	8,5
<i>C. glycolicum</i>	3	6,5	1	2,1	∅	∅
<i>C. innocuum</i>	2	4,3	8	16,6	4	6,8
<i>C. sordellii</i>	1	2,2	∅	∅	∅	∅
<i>C. paraputrificum</i>	4	8,7	1	2,1	2	3,4
<i>C. baratii</i>	∅	∅	1	2,1	3	5,1
<i>C. difficile</i>	∅	∅	1	2,1	1	1,7
<i>C. sporogenes</i>	1	2,2	2	4,2	∅	∅
<i>C. oescicum</i>	∅	∅	∅	∅	1	1,7
<i>C. tertium</i>	∅	∅	∅	∅	1	1,7
<i>Clostridium</i> spp.	13	28,3	18	37,5	18	30,5
Total de isolados	46		48		59	

Ignacio, 2014

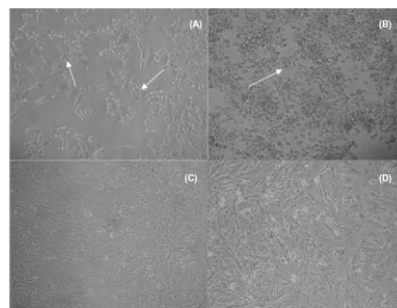
∅ ausência da espécie nas amostras analisadas.

Amostragem:
- 30 eutróficos
- 24 sobrepeso
- 30 obesos
Idade: 3 a 11 anos
Sem diarreia

57 cepas - Tipo A
TpeL - 8,77%
NetB - 12,2%

Teste citotóxico em células Vero

TpeL - 5 cepas

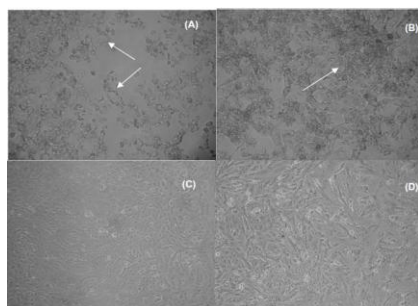


A: Isolado *tpeL*⁺/*alpha*⁺ (72h); B: Isolado *tpeL*⁻/*alpha*⁺; C: células Vero com BHI (72h); D: células Vero com DMEM (72h).

Ignacio, 2014

Teste citotóxico em células Vero

NetB - 7 cepas



A: Isolado *netB*⁺/*alpha*⁺ (72h); B: Isolado *netB*⁻/*alpha*⁺; C: células Vero com BHI (72h); D: células Vero com DMEM (72h).

Ignacio, 2014

Clostridium difficile

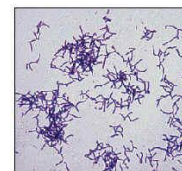
Clostridium difficile

*Características gerais

- Detectado pela primeira vez em 1934, como componente da microbiota de recém-nascidos e foi denominado de *Bacillus difficilis*.
- Essa espécie tem sido isolada de diversos habitats incluindo solo, pólen, areia, esterco de diversos animais (bois, cavalos e asno) e das fezes de cachorros, gatos, roedores e humanos.


Clostridium difficile

*Características gerais



- Foi verificado que a média de colonização, em recém-nascidos é alta entre 50 a 60% mas esses valores diminuem para 2 a 3% quando é estabelecida a "microbiota adulta", a partir de 3 anos de idade.

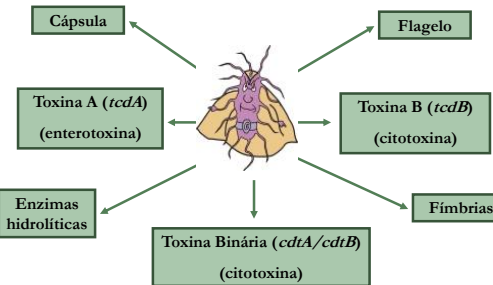
Clostridium difficile



CCFA (cicloserina, cefoxitina, frutose ágar)

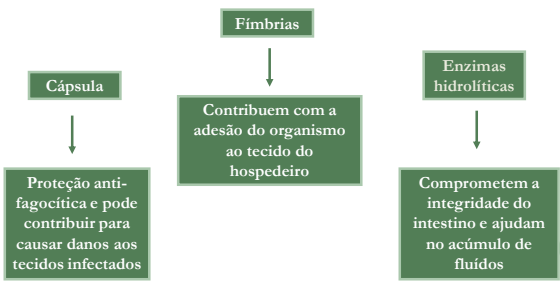
Clostridium difficile

***Fatores de virulência**



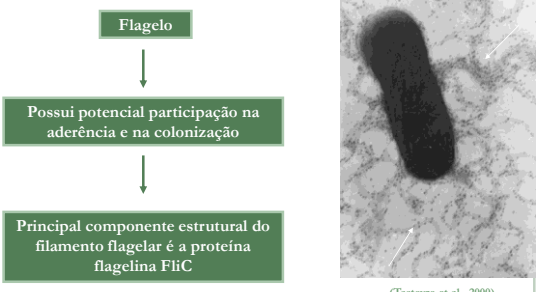
Clostridium difficile

***Fatores de virulência**



Clostridium difficile

***Fatores de virulência**

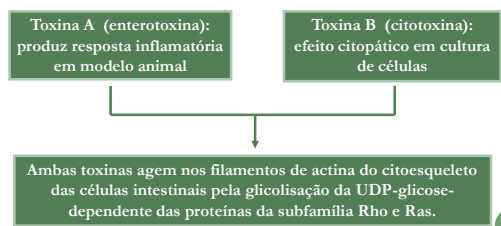


(Tasteyre et al., 2000)

Clostridium difficile

***Fatores de virulência – Toxinas A e B**

Pertencentes ao grupo das citotoxinas clostridiais LCT



Clostridium difficile

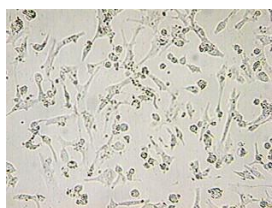
***Fatores de virulência – Toxinas A e B**

- Ambas toxinas são importantes para doenças em humanos, mas só a toxina A causa doença em modelo animal.
- Estudos mostram que a toxina B é pelo menos 10 vezes mais potente do que a toxina A em relação aos danos fisiológicos e morfológicos em linhagens celulares. (Bartlett, 2007)

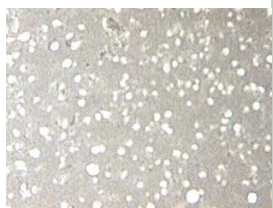
Clostridium difficile

*Fatores de virulência – Toxina B

Teste citotóxico em linhagem celular (Vero)



Controle da célula



Controle positivo

(Ferreira et al., 2000)

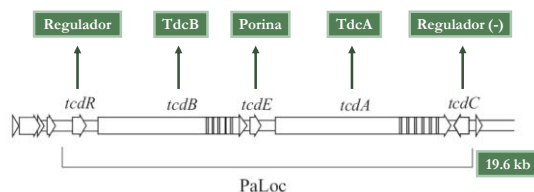
Clostridium difficile

*Fatores de virulência – Toxinas A e B

- As toxinas A e B são chamadas de TcdA e TcdB e são codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*.
- Junto com os genes *tcdR* (regulador), *tcdC* (regulador negativo) e *tcdE* (porina) formam o Locus de Patogenicidade (PaLoc) de 19.6kb inserido no cromossomo das cepas.

Clostridium difficile

*Fatores de virulência – Toxinas A e B



Alguns estudos tem sugerido que qualquer mutação ou mesmo deleção no gene *tcdC* pode permitir o aumento da produção das toxinas A e B (cepa hipervirulenta BI/NaP1/027 – associada a surtos).

(Sloan et al., 2008)

Clostridium difficile

*Fatores de virulência – Toxina binária

- A toxina binária CDT é uma citotoxina, membro do grupo das toxinas binárias de clostrídios que incluem também a toxina C2 de *C. botulinum*, a toxina iota (ι) e BEC de *C. perfringens* e a toxina CST de *C. spiroforme*.
- A toxina atua em sinergismo com as outras duas toxinas A e B causando diarreia e PMC em humanos e animais.

Clostridium difficile

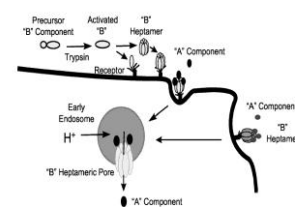
*Fatores de virulência – Toxina binária

- Estudos mostram que a prevalência da toxina binária CDT em humanos é relativamente baixa em relação a incidência em animais como cavalos, porcos e bezerros, entretanto esse número vêm aumentando com o passar dos anos. (Rupnik et al., 2007)

Clostridium difficile

*Fatores de virulência – Toxina binária

A toxina binária CDT é composta por duas proteínas independentes CDTa (componente catalítico) e CDTb (componente ligador)



(Barth et al., 2004)

Clostridium difficile

***Fatores de virulência – Toxina binária**

CDTb (componente de ligação) sofre proteólise e é ativado para se ligar ao receptor da célula na superfície celular

CDTa (componente enzimático) internaliza através do componente ligação

Dentro do citosol o CDTa, catalisa a ADP-ribosilação da actina monomérica levando a desorganização do citoesqueleto

Clostridium difficile

***Fatores de virulência – Toxina binária**

• CDTa é codificado pelo gene *cdtA* (1383 bp) e CDTb codificado pelo gene *cdtB* (2631 bp) ambos localizado no cromossomo, Locus CDT (4.3 Kb).

(Rupnik et al., 2009)

Clostridium difficile

***Fatores de virulência – Toxina binária**

• A toxina binária causam arredondamento e despolimerização dos filamentos de actina em células Vero. Esse efeito citotóxico é neutralizado pelo soro anti-Ib o mesmo da toxina τ de *C. perfringens*.

Clostridium difficile

***Fatores de virulência** Ribotipos - Epidemiologia

As cepas produtoras de toxinas podem apresentar as seguintes características:

Cepas / tipos	Citotoxina		Toxina Binária
	TcdA	TcdB	CDT
A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	+	+	-
A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	+	+	+
A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	-	+	-
A ⁻ B ⁺ CDT ⁺	-	+	+
A ⁻ B ⁻ CDT ⁺	-	-	+
A ⁻ B ⁻ CDT ⁻	Cepas não toxigênicas		

Clostridium difficile

***Importância clínica**

ANTIBIOTICOTERAPIA PROLONGADA

Ampicilina, Amoxicilina, Clindamicina, Cefalosporinas (↑ risco);
Carbapenêmicos, Quinolonas, Macrolídeos, Aminoglicosídeos e Tetraciclina (↓ risco)

CONSEQUÊNCIA

Diarreia associada ao uso de antibióticos

AAD (antibiotic-associated diarrhea)

15 a 25% dos casos

Colite pseudomembranosa

PMC (pseudomembranous colitis)

100% dos casos

Clostridium difficile

Risk factors

- Antibiotics → Alter the intestinal microbiota and disrupt its barrier effect
- Hospitalization → Endogenous or exogenous contamination

Spores germinate
Vegetative cells multiply
C. difficile adheres to mucus and enterocytes

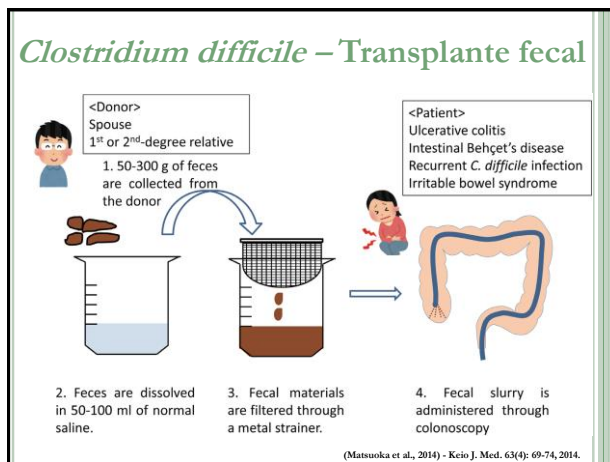
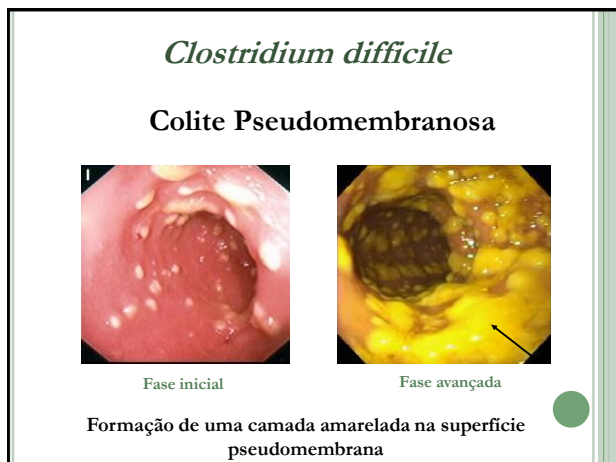
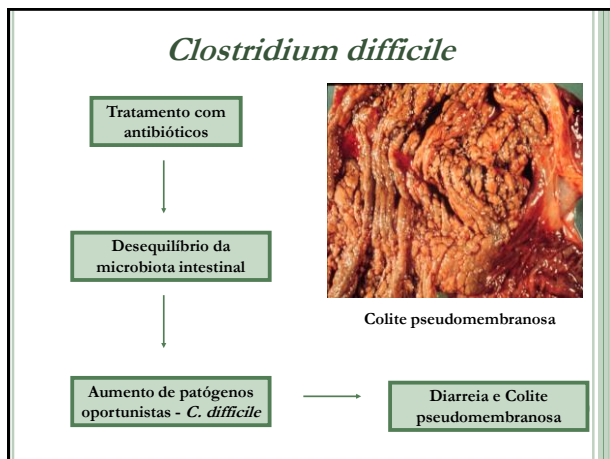
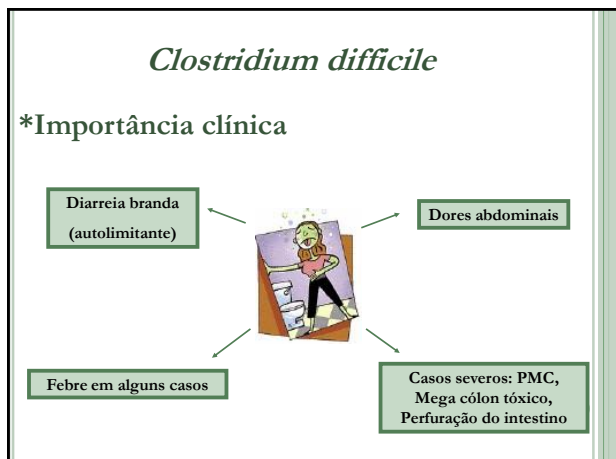
← Colonization factors

1st phase: Colonization

2nd phase: Toxin production ← TcdA, TcdB ± Cdt

No antibodies → Clinical manifestations

(D'eneve et al., 2009)



Hindawi Publishing Corporation
Scientifica
Volume 2014, Article ID 594014, 4 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2014/594014

Research Article

Genes Encoding Toxin of *Clostridium difficile* in Children with and without Diarrhea

Victor R. C. Merino,¹ Viviane Nakano,¹ Sydney M. Finegold,^{2,3,4} and Mario J. Avila-Campos¹

¹Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
²Veterans Affairs, West Los Angeles Medical Center, Los Angeles, CA, USA
³Department of Medicine, School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA, USA
⁴Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA, USA

110 crianças com e 150 sem diarreia – 1 mês a 8 anos de idades
qPCR para 16S RNA, *tcdA/tcdB* e *cdtA/cdtB*
Screening toxigênico – Xpect *C. difficile* toxin A/B

TABLE 2: Quantitative detection of *Clostridium difficile* and target genes in diarrhea and nondiarrhea samples.

Target gene	Diarrhea (n = 110)		Nondiarrhea (n = 150)		P
	Number (range of log ₁₀)	Mean ± SD	Number (range of log ₁₀)	Mean ± SD	
16S rRNA ^a	20 (1.2-6.9)	4.0 ± 1.7	37 (1.3-8.0)	4.8 ± 1.5	0.063
<i>tcdA</i>	1 (2.1)	ND	3 (1.3-7.6)	2.9 ± 1.3	ND
<i>tcdB</i>	0 (0)	ND	3 (3.2-5.3)	4.6 ± 1.2	ND
<i>cdtA</i>	1 (2.7)	ND	0 (0)	ND	ND
<i>cdtB</i>	1 (3.7)	ND	0 (0)	ND	ND

^aUsed to detect *C. difficile*.
ND: not determined.

57 crianças (21,9%) – *C. difficile*
1 crianças (*tcdA+/tcdB-* e *cdtA+/cdtB+*) – com diarreia
3 crianças (*tcdA+/tcdB+*) – sem diarreia
Xpect toxinA/B: negativo 57 amostras.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(4): 451-454, June 2003 451

Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil

Claudia EA Ferreira⁺⁺, Viviane Nakano, Edison I. Durigon, Mario J Avila-Campos⁺

Laboratório de Aueróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil

90 crianças com e 91 sem diarreia – 0 a 5 anos de idades

Citotóxico e Multiplex PCR - *tcdA/tcdB*

5,55 % de *C. difficile* – 10 cepas isoladas (só com diarreia)



TABLE III

Cytotoxicity on Vero cells and genotypes of *Clostridium difficile* recovered of children with diarrhea

Strain	Vero	Genes ^a		Genotypes
	cytotoxicity	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	
P2	-	-	-	<i>tcdA</i> ⁻ / <i>tcdB</i> ⁻
P3	+	-	+	<i>tcdA</i> ⁻ / <i>tcdB</i> ⁺
P27A	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺
P27C	+	-	+	<i>tcdA</i> ⁻ / <i>tcdB</i> ⁺
P27H	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺
P29B	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺
P29C	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺
P77E	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺
P77G	+	-	+	<i>tcdA</i> ⁻ / <i>tcdB</i> ⁺
P77I	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺
VPI 10463 ^b	+	+	+	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺

a: multiplex-PCR detection; b: reference strain *C. difficile* VPI 10463

10 cepas *C. difficile*

6 toxigênica *tcdA*⁺/*tcdB*⁺

3 toxigênica *tcdA*⁻/*tcdB*⁺

(Ferreira et al., 2003)

