

LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS

Gênero Clostridium

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>

Características Gerais de *Clostridium* spp.

Espécie	Doença	Transmissão	Ação da toxina
<i>Microbiota Exógena</i>			
<i>C. tetani</i>	Tétano	Esporos penetram ferimento	Bloqueia liberação de transmissores inibitórios
<i>C. botulinum</i>	Botulismo	Ingestão da exotoxina	Bloqueia liberação de acetil-colina

<i>Microbiota Residente</i>			
<i>C. perfringens</i>	- Gangrena	Esporos penetram ferimento	Lecitinase
	- Intoxicação alimentar	Ingestão da exotoxina	Super antígeno
<i>C. difficile</i>	Colite pseudo-membranosa	Desequilíbrio da microbiota por antibióticos	Citotoxina danifica mucosa do cólon

Grupos de espécies de *Clostridium*



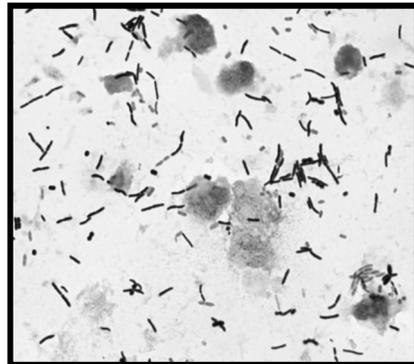
Grupo I: *C. perfringens*



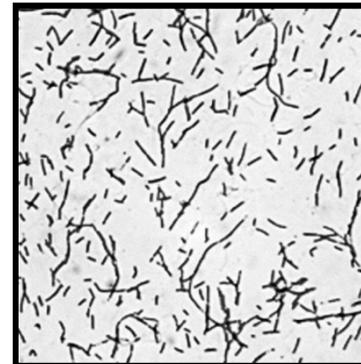
Grupo II: *C. tetani*



Grupo III: *C. botulinum*



Grupo IV: *C. difficile*



Grupo V: *C. ramosum*

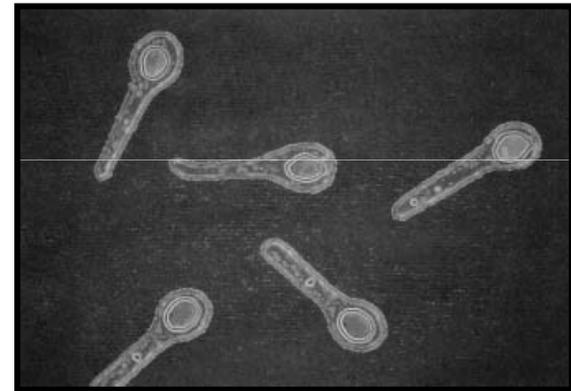
Microbiota Exógena

Clostridium tetani

Laboratório de Anaeróbios

Características Gerais

- Bacilos Gram positivos, esporulados e produtores de exotoxinas;
- Anaeróbios estrictos e não fermentam açúcares;
- Encontrados no solo, poeira e fezes de humanos e animais;
- Patogenicidade: exotoxina plasmidial - tetanospasmina e tetanolisina (hemolisina).



Tétano - Origem

- **Hipócrates (400 a.C.): manifestações clínicas.**
- **Carle e Rattone (1884): descreve agente etiológico**
- **Paralisia muscular espásmica (sintomas neurológicos - SNC) causa rigidez.**
- **Inibição da liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina nos neurônios motores.**
- **GABA: Principal neurotransmissor inibidor neurossináptico no SNC causando sedação; Regula o tônus muscular e a excitabilidade neuronal.**

Clostridium tetani

- **Toxina elaborada no sítio do trauma ou lesão.**

- **Liga-se rapidamente ao tecido neural: paralisia e espasmos.**

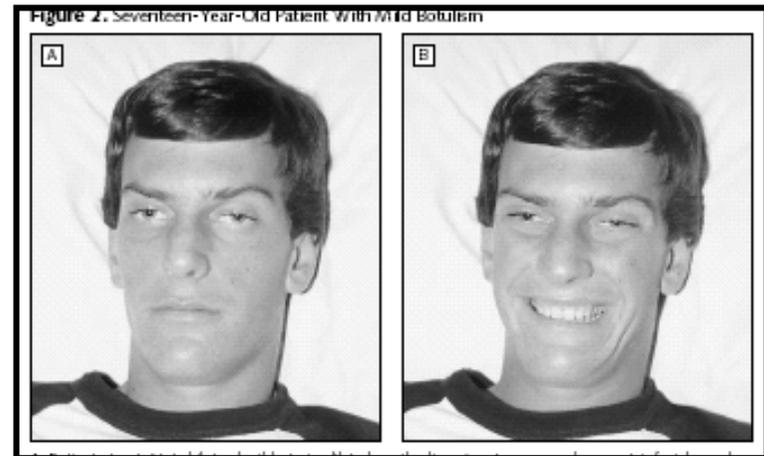
- **Produz 2 toxinas (metaloproteases).**
 1. **Tetanolisina (48 Kda): hemolisina sensível ao O₂.**
 2. **Tetanospasmina (150 Kda): sensível ao calor (50°C).**

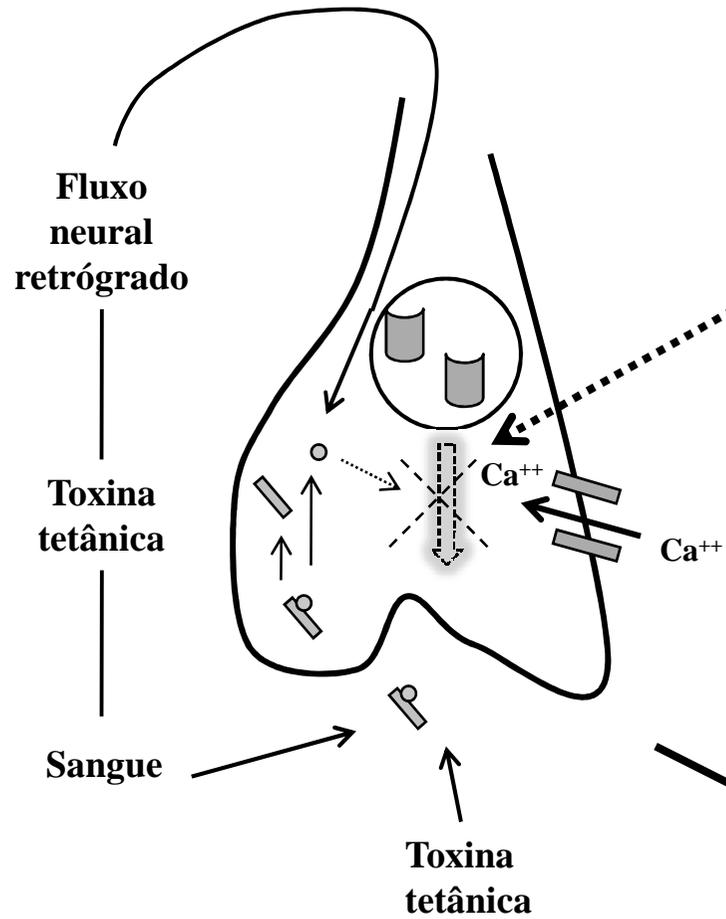
Clostridium tetani

➤ Tipos de Tétano

1. **Generalizado:** rigidez nos músculos voluntários (face-trismo, tronco).
2. **Localizado:** espasmos, aumento tônus muscular.
3. **Cefálico:** paralisia facial rígida (nervo craniano).
4. **Neonatal:** infecção umbilical.

Riso sardônico

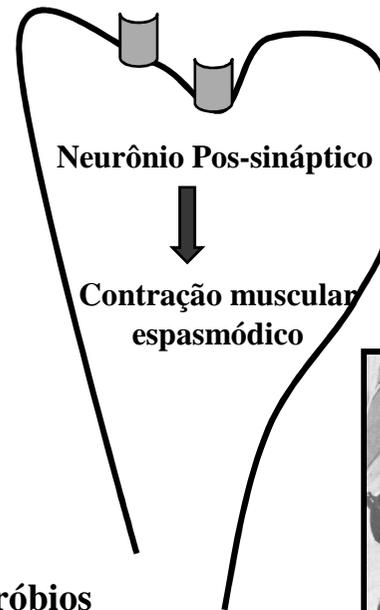




Toxina tetânica bloqueia a produção de neurotransmissores (GABA, Glicina) causando excitação desenfreada dos neurônios motores.



Ação da toxina tetânica



Laboratório de Anaeróbios

Diagnóstico

- **Baseia-se no quadro clínico**
- **Morte por interferência na respiração**
- **Mortalidade elevada no tétano generalizado**

Prevenção

- **Imunização com toxóides**
- **Cuidados das feridas contaminadas**
- **Profilaxia com antitoxina**
- **Administração de penicilina**

Microbiota Exógena

Clostridium botulinum

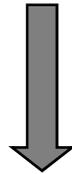
Botulismo

Latim - “Botulus” = salsicha

Surtos epidêmicos devido a salsichas de origem caseira.

Primeira descrição da doença na Europa (Alemanha) no século

XVIII

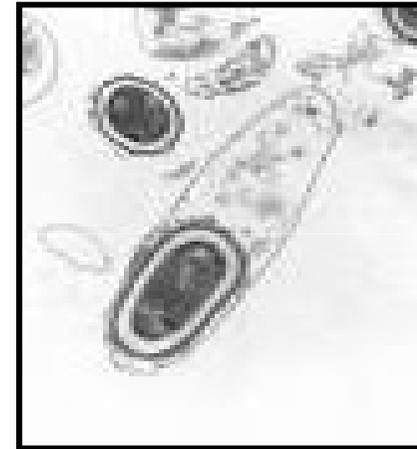


**Ocorrência súbita com manifestações neurológicas de evolução
dramática e de elevada letalidade**

Clostridium botulinum

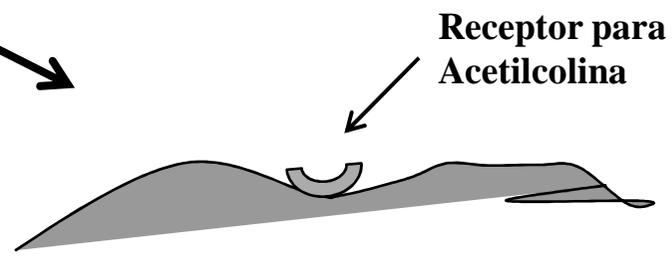
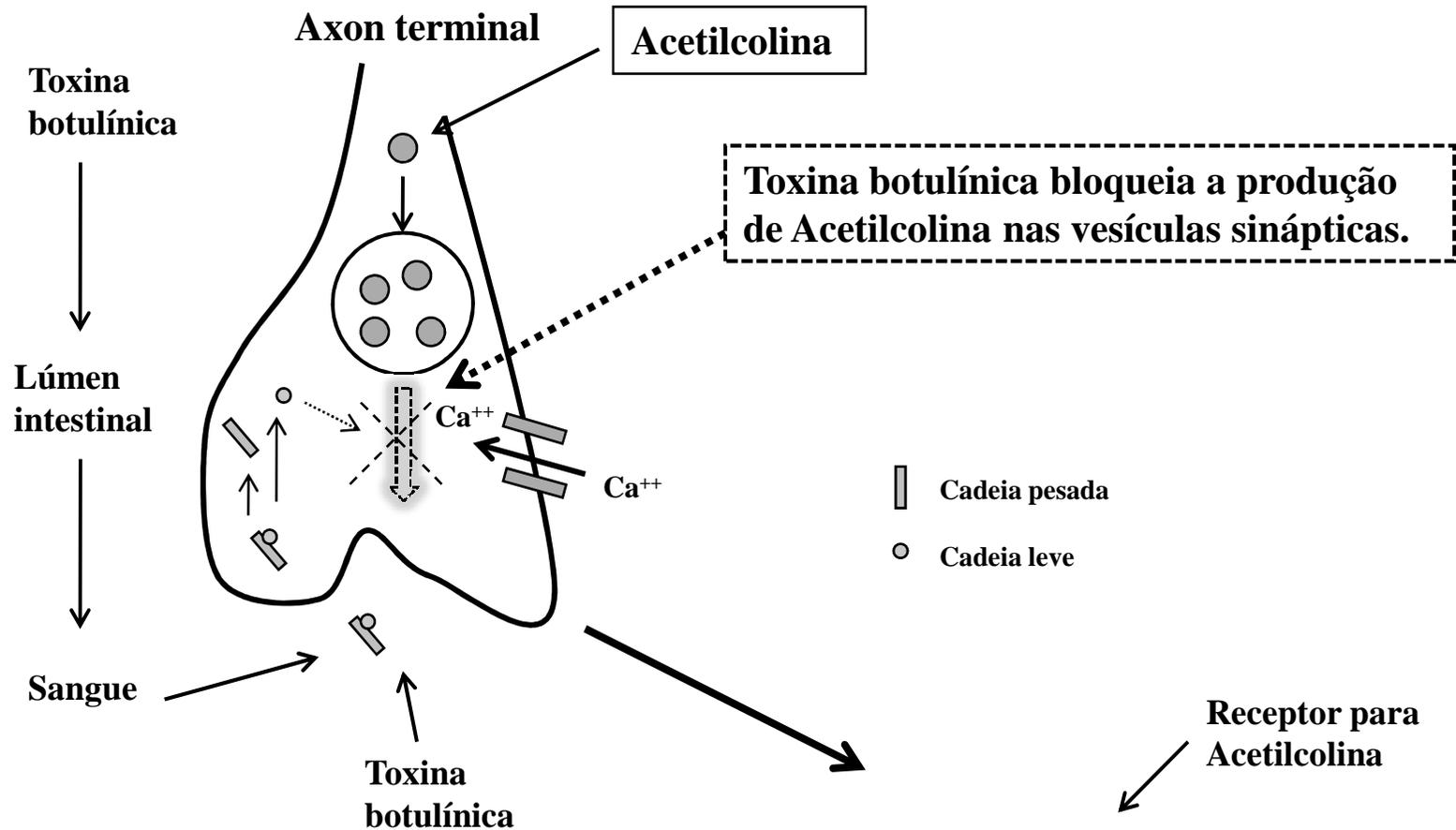
- **Resistente a pH ácido, e a 60 °C x 20 min.**
- **Alimentos mal conservados ou inadequadamente esterilizados.**
- **Produz potente neurotoxina.**
- **Existem 7 tipos toxigênicos:**
 - **Tipo A, B, E e F: homem.**
 - **Tipo E: peixes.**
 - **Tipo C**

{	C1: Neurotoxina - Aves.
	C2: Permeabilidade vascular - ovinos e bovinos.
 - **Tipo D: Bovino, ovino, equino.**
 - **Tipo G: *C. argentinense*.**



Toxina Botulínica

- **Exotoxina potente, neurotrópica, letal por ingestão;**
- **Sem cor, sem odor, estável em condições ambientais;**
- **Inativada a > 85 °C por 5 min;**
- **Sintomas de 2 h a 5 dias.**
- **Paralisia flácida originada no sistema nervoso periférico**
- **Inibe a liberação de Acetilcolina na junção neuromuscular esquelética (bloqueio das junções colinérgicas e motoras voluntárias)**



Ação da toxina botulínica

Tipos de botulismo

- **Botulismo Alimentar:** Toxina pré-formada. Dor abdominal, Paralisia flácida e respiratória.
- **Botulismo Ferimento:** Forma rara. Feridas em contato com toxinas.
- **Botulismo Infantil:** Coloniza trato gastrintestinal de recém nascidos. Ingestão de toxina com alimentos (mel de abelha).
- **Botulismo Bovino:** Paralisia muscular e morte. Ingestão de carcaças com toxinas.



Botulismo infantil



Botulismo ferimento



Alimentar (incubação 6 h a 8 dias)



Alimentar (geléia de mocotó)

Botulismo Humano

- Sintomatologia inicial:

Constipação, debilidade, vertigem, alterações da visão (turva, dupla ou fotofobia), xerostalmia, flacidez das pálpebras, rouquidão, afonia, distúrbios de deglutição, flacidez muscular generalizada (face e pescoço – cabeça pendente).



Laboratório de Anaeróbios

Botulismo - Tratamento

- Soroterapia: soro anti-botulínico específico ou polivalente (anti-A, B, E e F) ou Trivalente: A, B e E.
- Tratamento de suporte: nutrição parenteral, ventilação mecânica, tratamento de infecções secundárias.
- Recuperação lenta (meses): até terminações do axônio motor se regenerem.
- Profilaxia: vacina Pentavalent (A-E) Toxoid (CDC/Atlanta).



Laboratório de Anaeróbios

Bioterrorismo - Disseminação

1) Aerossol: incapacita ou mata 10% das pessoas até 500 m a partir do ponto de origem do aerossol.

Obs. 1 g de toxina cristalina (dispersada e inalada) mata > 1 milhão de pessoas.

2) sabotagem de alimentos/bebidas

- Períodos de incubação: 1 - 5 dias. Ingerido (24-36 h); inalado até 5 dias.

- Duração da doença: Morte (3 dias) ou hospitalização (meses)

- Letalidade: elevada \cong 60%.

Aplicações Médicas

- Tratamento do estrabismo desde 1981;**
- Blefarospasmo: contrações da pálpebra (piscam e fecham olhos involutariamente);**
- Distonia cervical: Movimentos intermitentes da cabeça e pescoço;**
- Distonia Laringeal: Contrações da pregas vocais, som prejudicado.**

APLICAÇÕES MÉDICAS



botox



Laboratório de Anaeróbios

Microbiota Residente

Clostridium difficile

Laboratório de Anaeróbios

Características Gerais

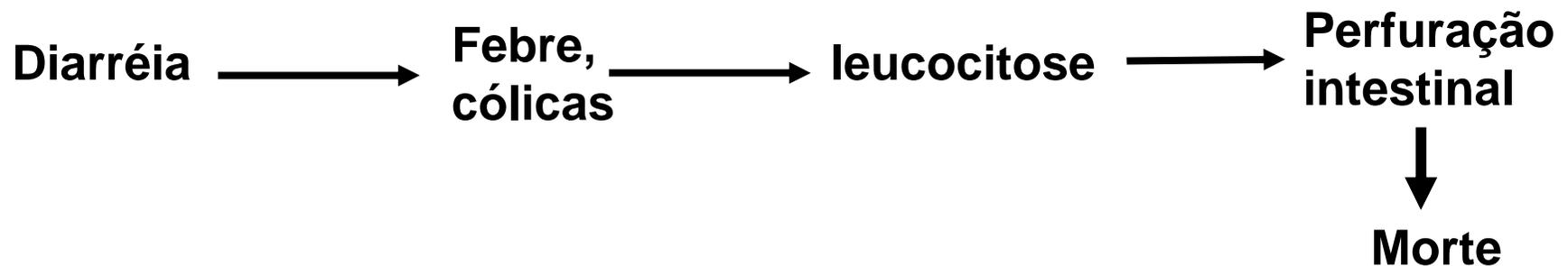
- **Finney (1983):** descreve colite pseudomembranosa
- **Hall & Toole (1935):** em recém nascidos sadios descobre *Bacillus difficilis* (hoje *Clostridium difficile*)
- **Bacilos Gram-positivos, forma endosporos**
- **Habitam intestino humano e animais**
- **Considerados microbiota residente suplementar**
- **Presente em \pm 3% adultos e \pm 66% crianças**

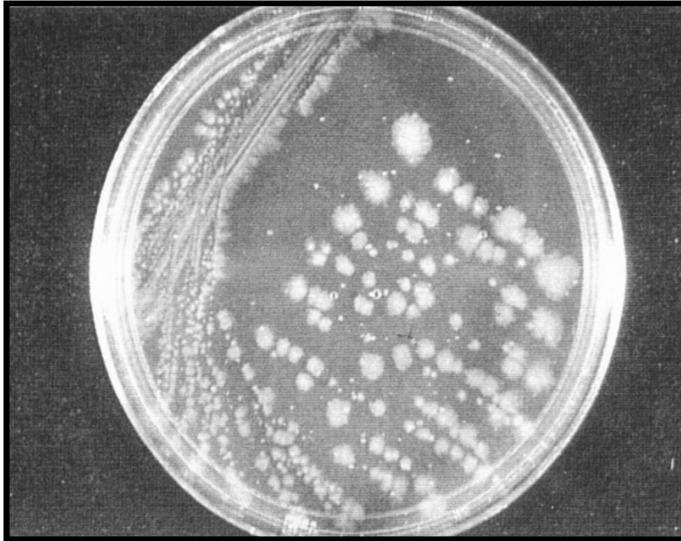
Clostridium difficile

➤ **Colite pseudomembranosa ou colite associada a antibióticos.**

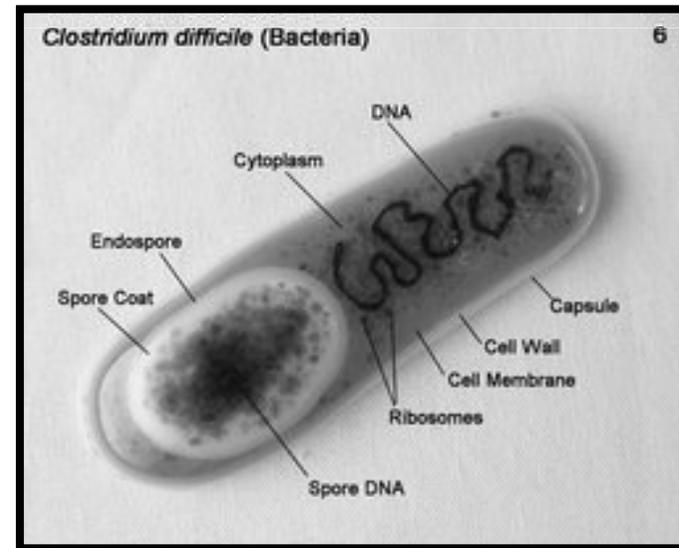
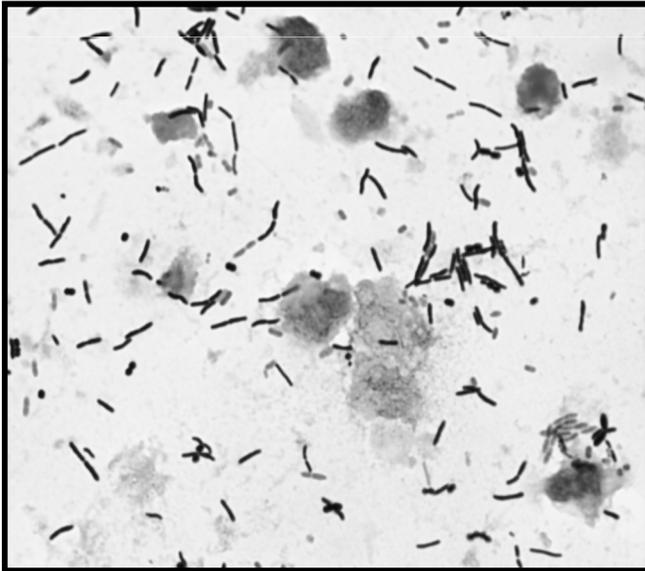
➤ **Produz 2 toxinas** {
Toxina A: Enterotoxina (libera fluidos)
Toxina B: Citotoxina (efeito citopático).

➤ **Ocorrência do processo:**





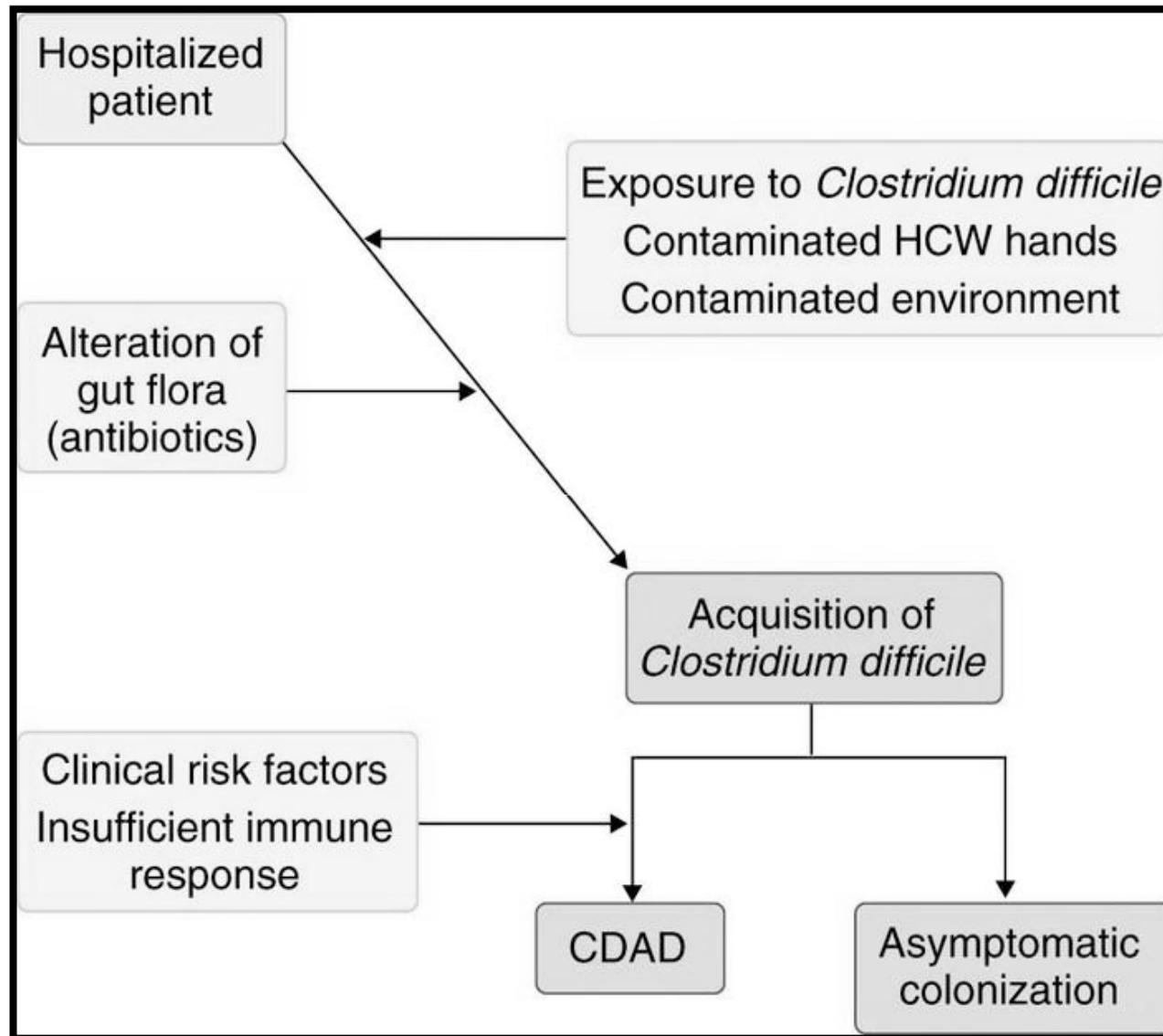
**Crescimento em meio cicloserina,
cefotaxima, frutose, ágar (CCFA)**



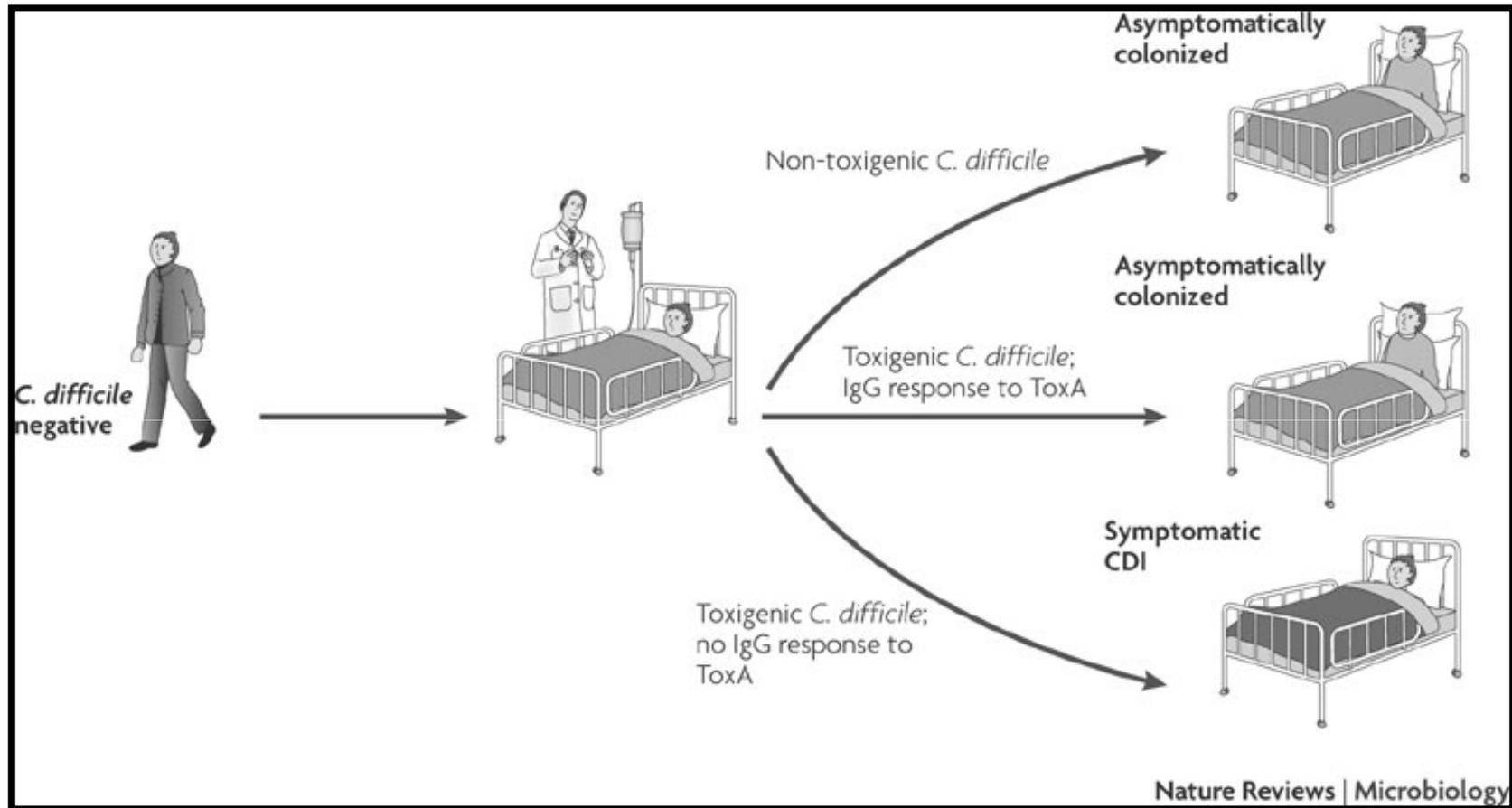
Coloração de Gram

Laboratório de Anaeróbios

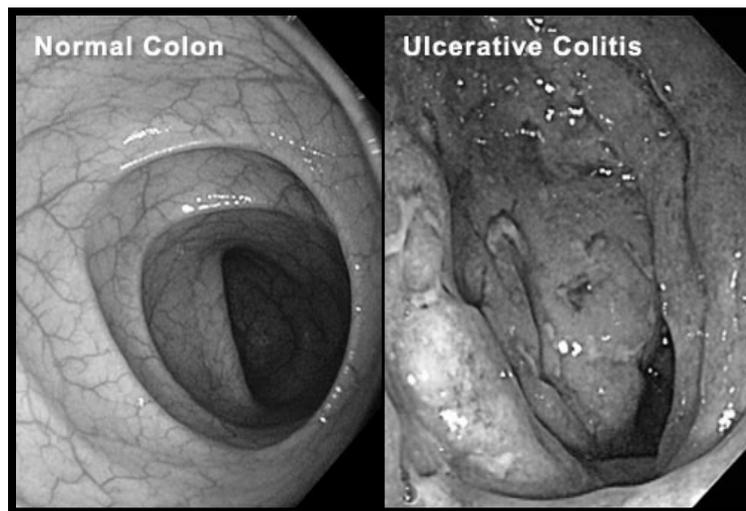
Fatores na aquisição hospitalar de *C. difficile*



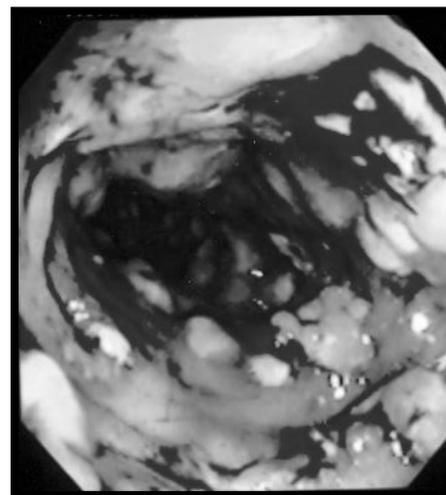
Transmissão hospitalar de *C. difficile*



Colite pseudomembranosa



Colite nodular



Colite crônica - Paciente HIV+

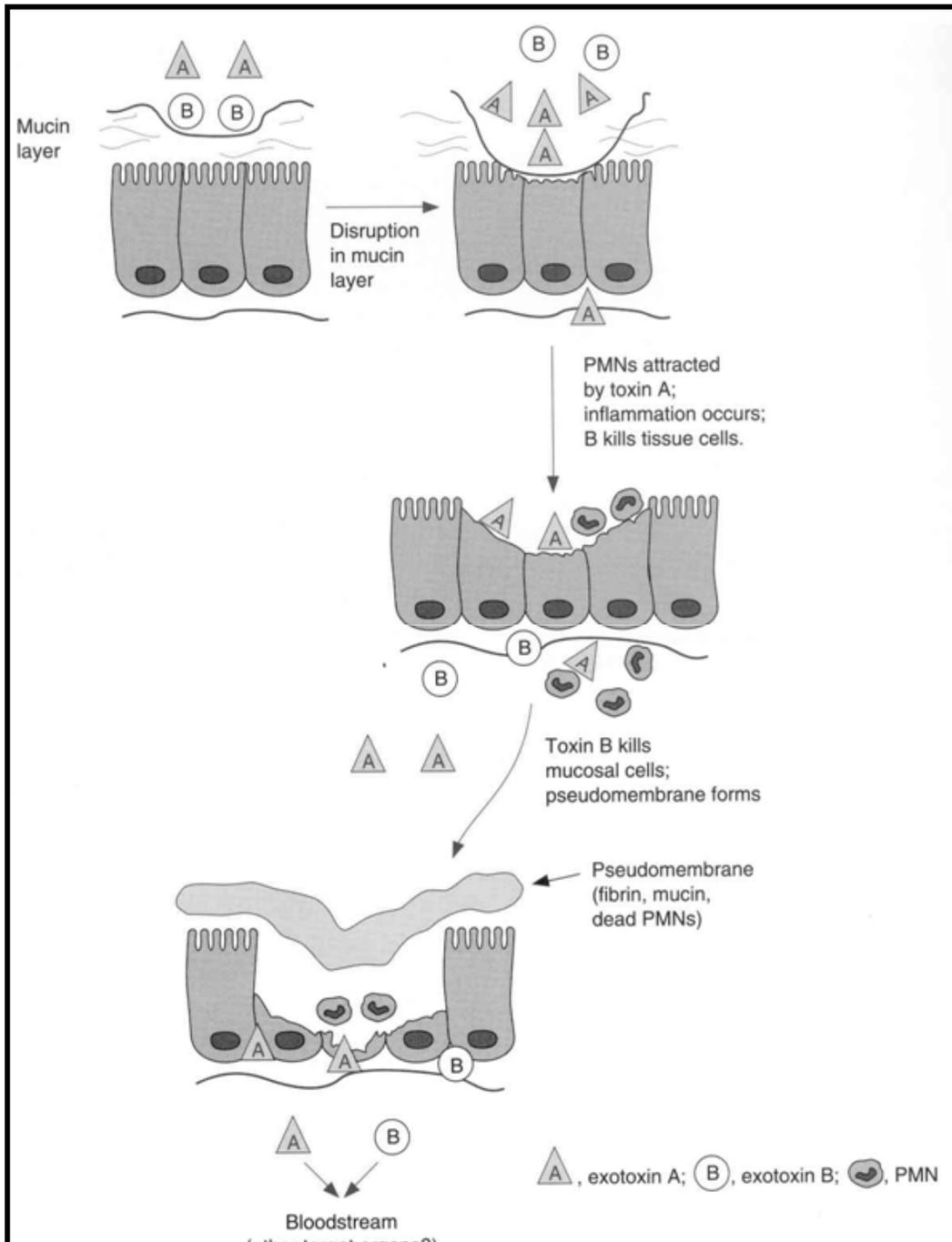
Patogênese

1. Toxina A – enterotoxina:

- Aumento da permeabilidade da mucosa;
- Passagem de água e eletrólitos para luz intestinal;
- Destruição das “zonas oclusivas” do epitélio.

2. Toxina B – citotoxina:

- Destruição do citoesqueleto;
- Despolimeriza os filamentos de actina.

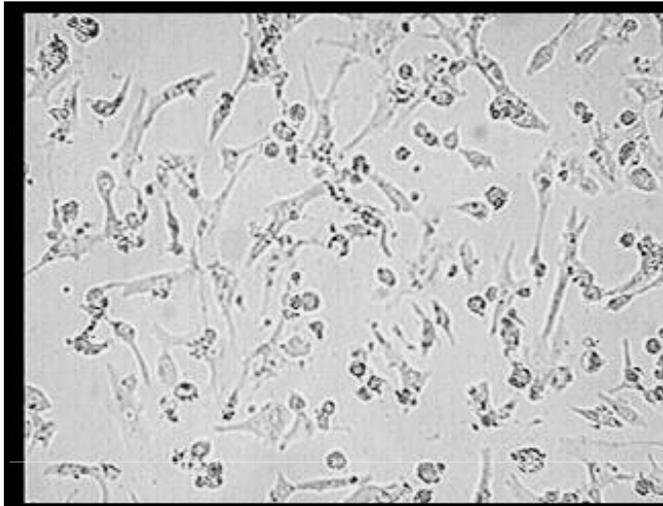


Ação das exotoxinas A (TcdA) e B (TcdB) de *C. difficile*.

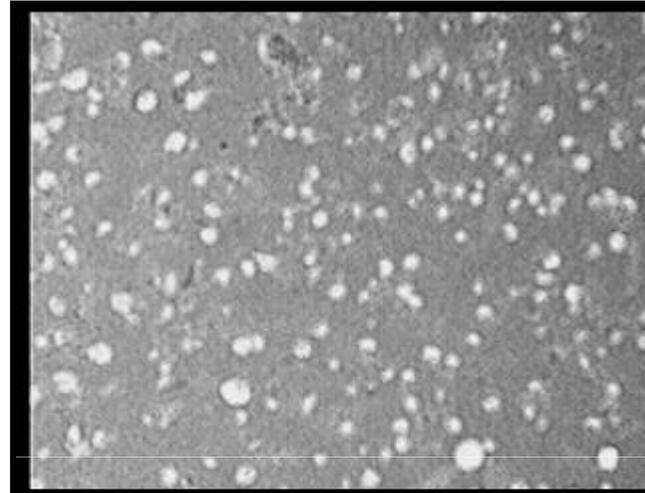


Algumas espécies podem produzir a toxina binária (CDT).

Efeito citotóxico de *C. difficile* em células VERO



Controle



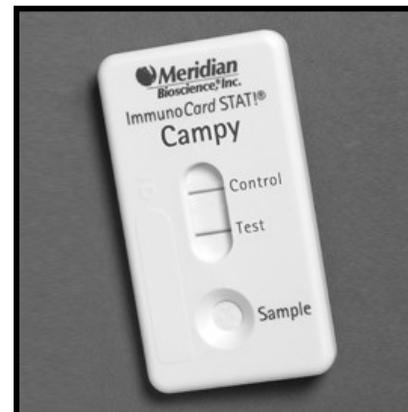
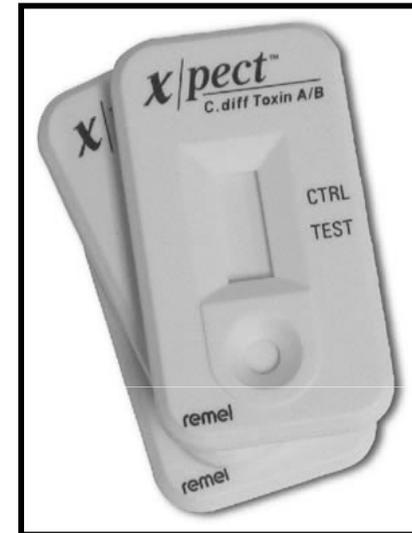
Efeito citotóxico



— 1216 bp (Toxina A)
— 1050 bp (Toxina B)

Deteção de genes *tcdA* e *tcdB* por PCR-multiplex

Kits comerciais para detecção das toxinas A e B



Tratamento

- **25% a 40% de pacientes com colite ulcerativa precisam de cirurgia: remoção cólon (intestino grosso) e reto**
- **Uso de Metronidazol (500 mg) 3 vezes/dia durante 10 dias**
- **Uso de vancomicina (125 mg) 4 vezes/dia durante 10 dias**
- **Transplante de microbiota fecal (91% efetivo)**
- **Uso de probióticos**

Microbiota Residente

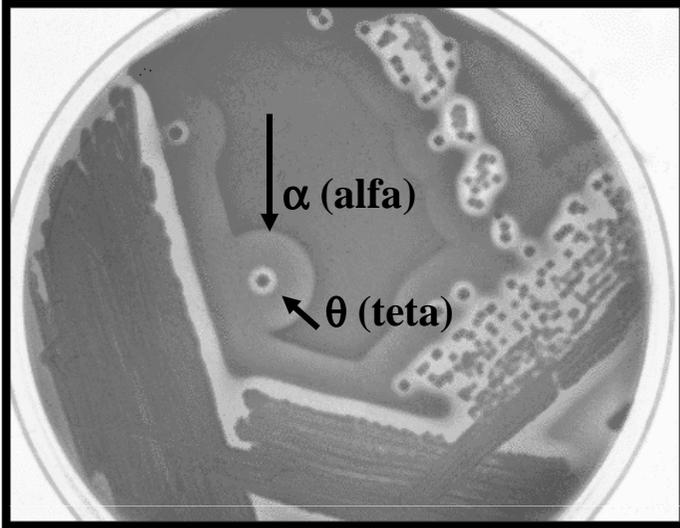
Clostridium perfringens

Laboratório de Anaeróbios

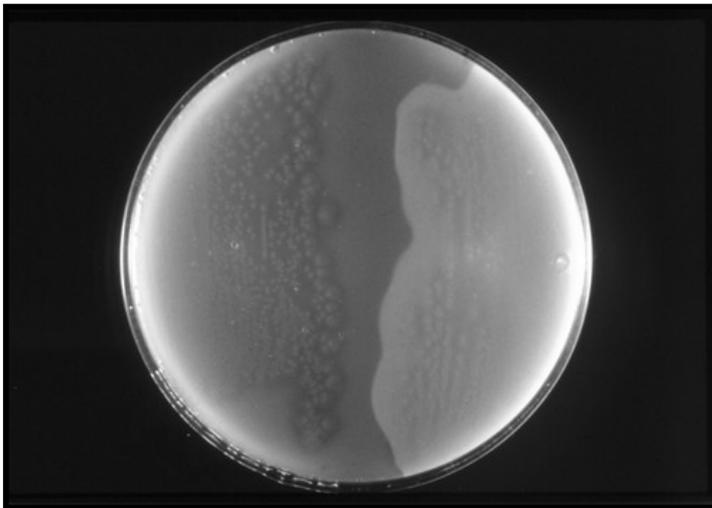
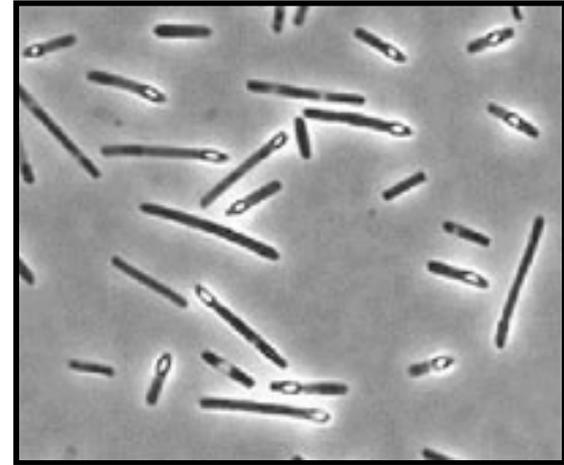
Clostridium perfringens

- **A mais isolada de espécimes clínicos: queimaduras, feridas traumáticas, aspiração pulmonar, trato vaginal, abortos, etc.**
- **Produz dupla hemólise: Toxinas alfa e teta.**
- **Não produz aminoácidos essenciais para seu crescimento, por isso, lisa células eucarióticas.**
- **Produz grandes (NetB, TpeL) e pequenas toxinas (colagenases, neuraminidases).**
- **Toxina TpeL: citotoxicidade e apoptose em células eucarióticas.**

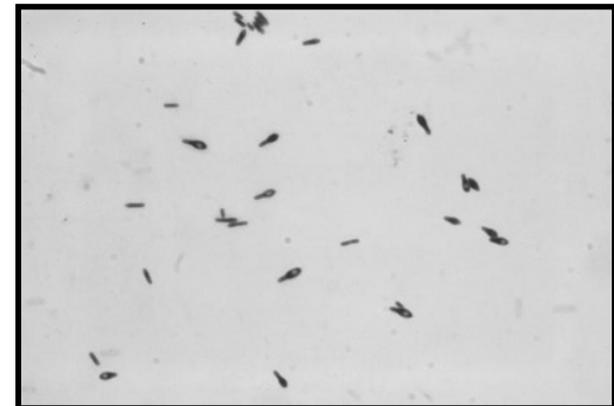
Clostridium perfringens



Dupla hemólise



lecitinase



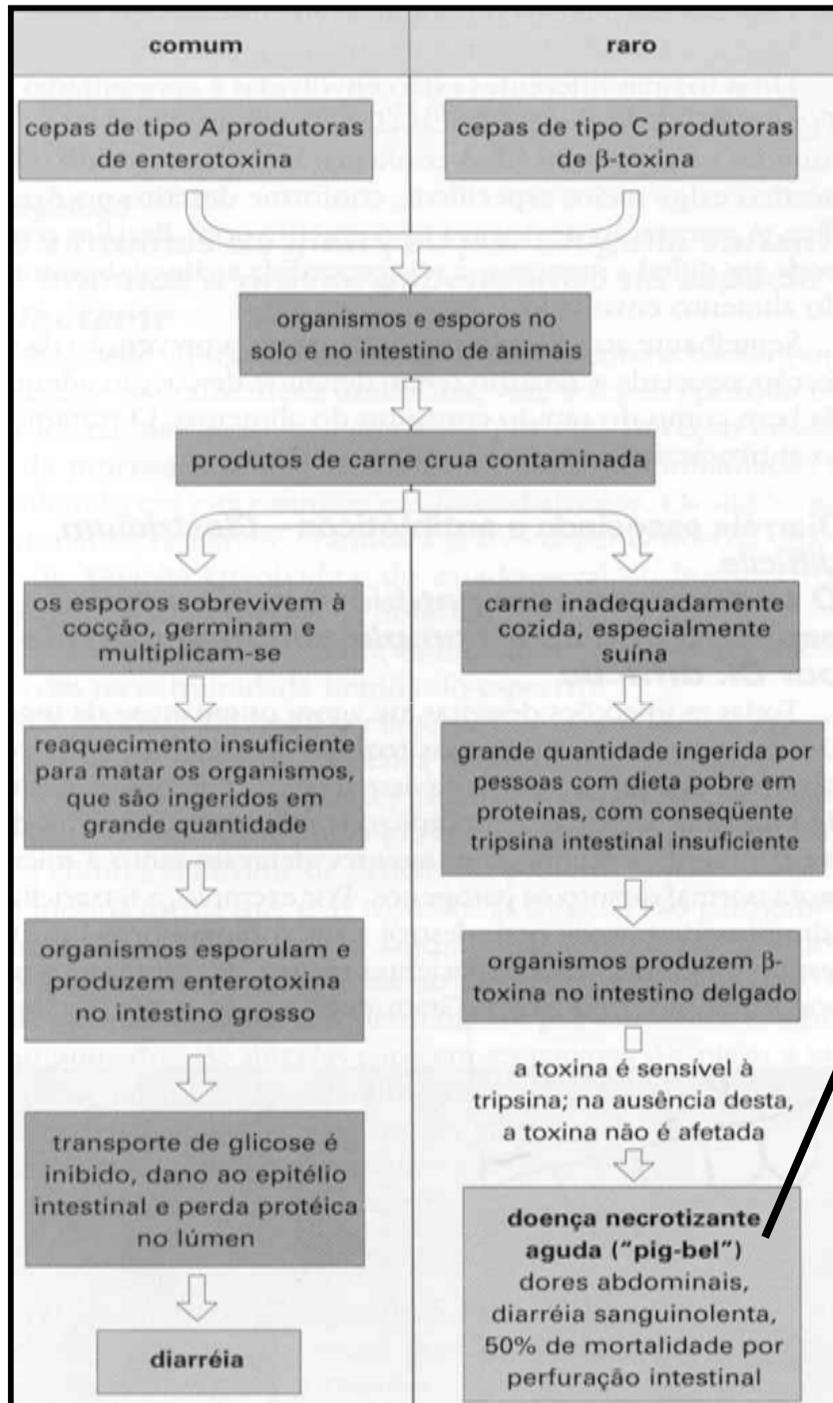
Clostridium perfringens

➤ **Tipos de *C. perfringens* segundo a produção de toxinas**

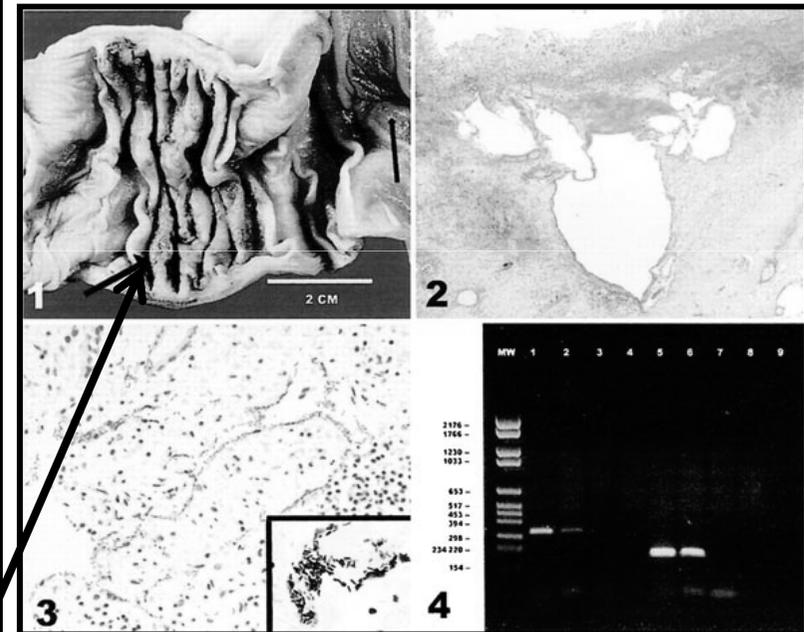
- 1. Tipo A: produz toxina alfa (fosfolipase C).**
- 2. Tipo B: produz toxinas alfa, beta e epsilon.**
- 3. Tipo C: produz toxina alfa e beta (necrotizante).**
- 4. Tipo D: produz toxinas alfa e epsilon (permease).**
- 5. Tipo E: produz toxinas alfa e iota (necrotizante).**

Toxina NetB (Necrotic Enteritis Toxin B-like) e TpeL (toxin *C. perfringens* Large Cytotoxin)

- Em humanos e animais produzem EN**
- Homologia com as toxinas A e B.**
- Atividade na membrana induzindo a formação de poros.**
- Ação citotóxica produzindo arredondamento celular.**
- Induzem apoptose.**

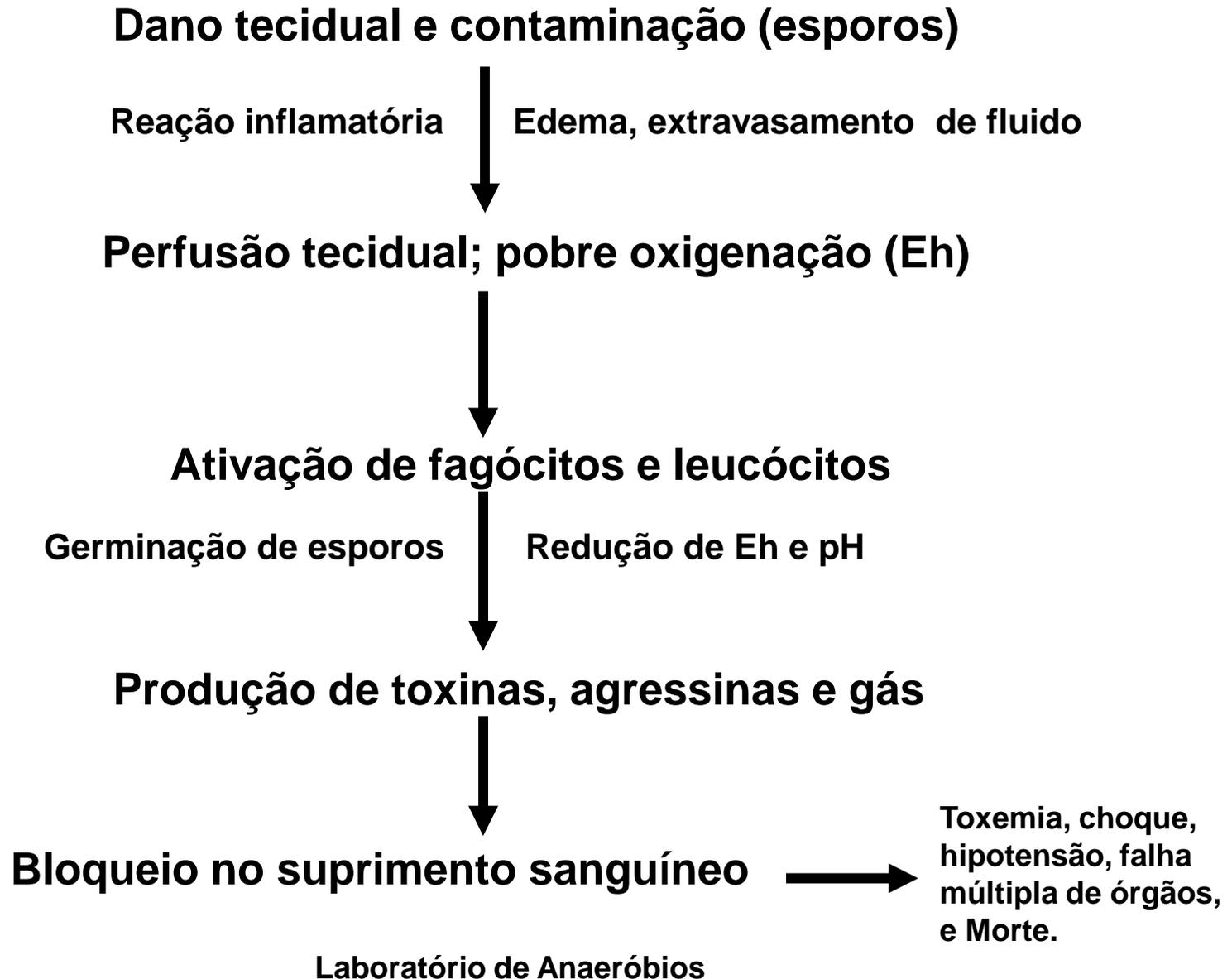


C. perfringens: Formas de infecção alimentar



Laboratório de Anaeróbios

Etapas na produção de gangrena gasosa



Gangrena gasosa

