



Universidade de São Paulo  
 Instituto de Ciências Biomédicas  
 Departamento de Microbiologia



## Bacilos Gram Positivos

Profa Dra Ana Marcia de Sá Guimarães

---

---

---

---

---

---

---

---

1

## Micro-organismos anaeróbios

---

---

---

---

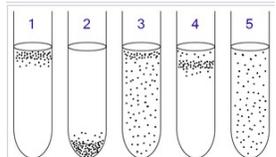
---

---

---

---

2



### Respiração bacteriana

- 1: **Aeróbios obrigatórios** = precisam de oxigênio porque eles não podem fermentar ou respirar anaerobicamente. Eles se encontram no topo do tubo, onde a concentração de oxigênio é alta.
- 2: **Anaeróbios obrigatórios** = oxigênio é letal para esses micro-organismos. Eles se concentram no fundo do tubo, onde a concentração de oxigênio é a menor.
- 3: **Anaeróbios facultativos** = podem crescer com ou sem oxigênio porque eles podem metabolizar energia aerobicamente ou anaerobicamente. Eles vão se encontrar distribuídos, mas a maioria no topo porque a respiração aeróbia gera mais ATP do que a fermentação ou respiração anaeróbia.
- 4: **Microaerófilos** = precisam de oxigênio porque eles não fermentam ou fazem respiração anaeróbia. Porém, a alta concentração de oxigênio na atmosfera é tóxica para eles. Eles se acumulam na parte superior do tubo, mas não no topo.
- 5: **Anaeróbios aerotolerantes** = não requerem oxigênio, pois metabolizam energia anaerobicamente. Mas contrário dos anaeróbios obrigatórios, o oxigênio não é tóxico para eles. Eles vão se distribuir por todo tubo.

---

---

---

---

---

---

---

---

3

### Características gerais

- Presentes em microbiota e isolados de diversas infecções
- Toleram **O<sub>2</sub> de 0.1 a 5%** com 10% de CO<sub>2</sub>.
- Ar atmosférico tem 21% de O<sub>2</sub>, 78% de N<sub>2</sub>, 0,03 de CO<sub>2</sub> e 0,91% de gases nobres.
- Exigem um **potencial de oxirredução (Eh) baixo**.



4

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Características gerais

- Dificil caracterização - **culturas mistas** com outras bactérias anaeróbias estritas e/ou facultativas.
  - 6 espécies de importancia
1. *Clostridium* spp
  2. *Bacteroides fragilis*
  3. *Porphyromonas* spp
  4. *Prevotella* spp
  5. *Fusobacterium* spp
  6. *Propionobacterium acnes*

5

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Características gerais Patogenia

- Microbiota de mucosas e na pele = principal fonte de infecção (com exceção de *Clostridium* spp)
- Ações benéficas: produção de vitamina K, metabolismo de ácidos graxos, ativação de ácidos biliares
- Ações maléficas: infecções endógenas



6

---

---

---

---

---

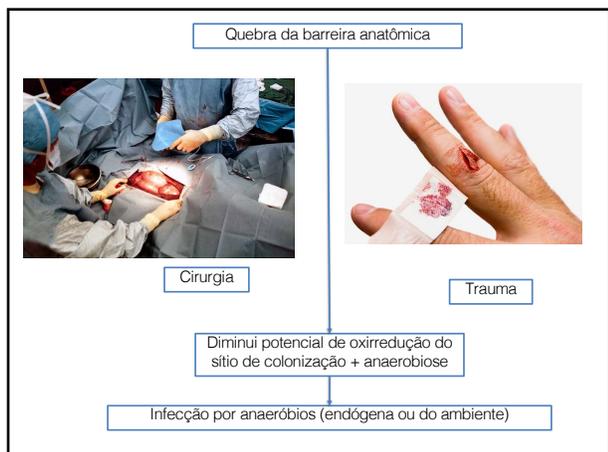
---

---

---

---

---



7

---

---

---

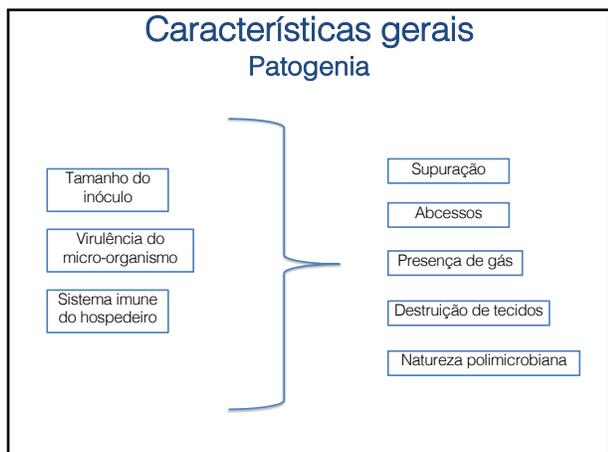
---

---

---

---

---



8

---

---

---

---

---

---

---

---

*Clostridium spp*

9

---

---

---

---

---

---

---

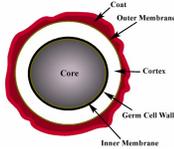
---

## *Clostridium* spp

- Gram +, bastonetes grandes
- Anaeróbios estritos (alguns aerotolerantes)
- Endoesporos
- Ubiquitários do solo, água e esgoto; e microbiota intestinal de humanos e animais
- Maioria = saprófitas e inofensivos
- Porém, alguns causam doença, que é atribuída à:



1. Esporulação
2. Rápido crescimento em ambientes com nutrientes desprovidos de oxigênio
3. Produção de diversas toxinas histolíticas, enterotoxinas e neurotoxinas



10

---

---

---

---

---

---

---

---

## *Clostridium* spp

- Espécies podem ser divididas em três categorias

1. Histotóxicas *C. perfringens*

2. Enterotóxicas *C. perfringens*  
*C. difficile*

3. Neurotóxicas *C. botulinum*  
*C. tetani*

11

---

---

---

---

---

---

---

---

## *Clostridium* spp Histotóxicas

12

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium perfringens*



13

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium perfringens*

- Gangrena gasosa
- Grande bastonete (0,6 a 2,4 x 1,3 a 19,0 µm)
- Um dos poucos clostrídeos imóveis
- Endoesporos são raramente observados *in vivo* ou *in vitro*
- Rápido crescimento em meio de cultura
- Causa doenças intestinais graves (enterotóxico) e infecções histotóxicas

14

---

---

---

---

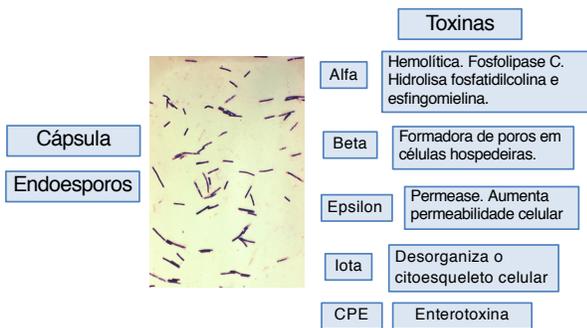
---

---

---

---

### *C. perfringens* – Fatores de virulência



15

---

---

---

---

---

---

---

---



### *Clostridium perfringens* tipo A Intoxicação alimentar

- Intoxicação alimentar – toxina do *C. perfringens* tipo A.

Subnotificada.  
 Curto período de incubação (8-24hs).  
 Diarréia aquosa sem febre.  
 Carne contaminada com grande qtidade de organismos do tipo A com CPE.

#### CDC names top five foodborne illnesses in United States

BY NEWS DESK | JANUARY 11, 2018

The top five germs that cause illnesses from food eaten in the United States are norovirus, Salmonella, Clostridium perfringens, Campylobacter and Staphylococcus aureus, aka staph.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

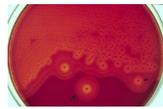
19

### *Clostridium perfringens* Diagnóstico laboratorial

- Pouca utilidade clínica devido ao rápido desenvolvimento da doença. Rastreamento de intoxicação alimentar.
- *C. perfringens* é aerotolerante e de fácil isolamento

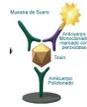


Figure 1. Detection of *C. perfringens* alpha toxin gene amplified by PCR. M= 100 bp molecular weight marker ladder; 1-5= clinical samples; 6= *C. perfringens* ATCC 3624 (Type A); 7= negative control.



Ágar sangue em anaerobiose. Hemólise.

PCR – detectar o gene da toxina A



ELISA

Intoxicação alimentar: Detecção da CPE no conteúdo intestinal

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

20

### *Clostridium* spp Enterotóxicas

---

---

---

---

---

---

---

---

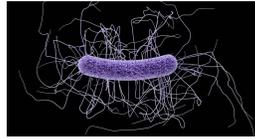
---

---

21

## Clostridium difficile

- Anaeróbio aerotolerante
- Cápsula
- Móveis
- Endosporos
- Fimbrias
- **Doença nosocomial** (colite pseudomembranosa).
- Dificil controle hospitalar
- Associada ao **uso de antibióticos de amplo espectro**, estresse (hospitalização), quimioterapia e uso de anti-inflamatórios não esteroidais.



22

---

---

---

---

---

---

---

---

## Clostridium difficile

- Toxina A (enterotoxina) = morte celular (pp enterócitos)
- Toxina B (citolisina) = morte celular
- ADP-ribosiltransferase = ADP-ribosilação da actina da célula hospedeira = desorganiza o citoesqueleto = morte celular.



23

---

---

---

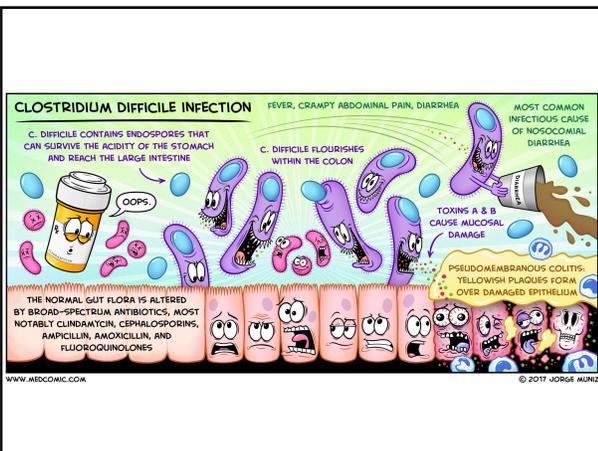
---

---

---

---

---



24

---

---

---

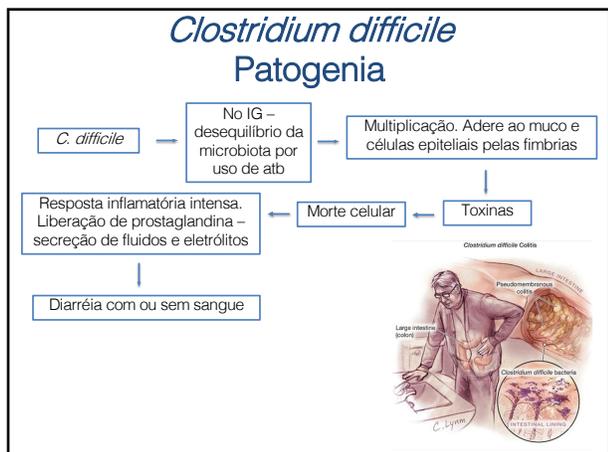
---

---

---

---

---



25

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium difficile* Diagnóstico laboratorial

- Histórico, sinais clínicos e lesões (suspeita)
- Isolamento de *C. difficile* nem sempre é diagnóstico.
- Toxina é o alvo ideal.

**ELISA (proteína) e PCR (gene) da toxina A/B**

**Agar seletivo para *C. difficile***  
Peptona, frutose, sais, gema de ovo, antibióticos para inibir crescimento de outras bactérias, indicador de pH

**Agar cromogênico para toxinas**

26

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium* spp Neurotóxicas

27

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium tetani*

- Tétano
- Aneróbio **obligatório**
- Endoesporo
- Muito difícil de cultivar



Ubiquitários do solo



\* Podem colonizar transitoriamente trato GI



Duas toxinas importantes:  
**tetanospasmina** e hemolisina

28

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium tetani* Patogenia

```

    graph TD
      A[C. tetani no ambiente] -- Trauma --> B[Multiplicação. Produção de tetanospasmina.]
      B --> C[Toxina atinge o neurônio motor da medula espinhal]
      C --> D[Cliva sinaptobrevinas]
      D --> E[Glicina e GABA (neurotransmissores inibitórios) não são mais liberados]
      E --> F[Atividade sináptica excitatória desregulada]
      F --> G[Paralisia espástica]
  
```



Tétano pode ser generalizado ou localizado.  
Mortalidade de 30-50% em humanos

29

---

---

---

---

---

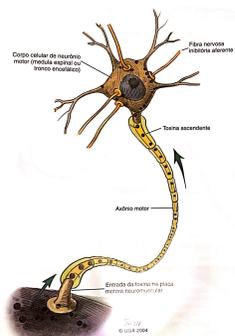
---

---

---

---

---



**Figura 41.1** Transporte retroaxonal de tetanospasmina. A toxina penetra na placa neuromuscular (A) e migra por transporte retrógrado dentro dos axônios motores, até o corpo celular do neurônio dentro da medula espinhal. Na medula espinhal, a toxina ascende até alcançar o encéfalo.

- A toxina penetra nos axônios dos nervos motores mais próximos da placa motora neuromuscular e migra por transporte retrógrado dentro dos axônios motores, até o corpo celular do neurônio dentro da medula espinhal. Na medula espinhal, a toxina ascende até alcançar o encéfalo.

30

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### *C. tetani* Diagnóstico laboratorial

- Diagnóstico é clínico
- ELISA para anticorpos contra toxina tetânica – pouquíssimo sensível
- Isolamento normalmente falha. Aeróbio estrito (transporte é um problema). Ágar sangue e anaerobiose, 12 dias a 37°C.



31

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium botulinum*

- Botulismo
- Aneróbio obrigatório
- Díficil isolamento
- Endoesporos
- 7 neurotoxinas (A-G)



Ubiquitários do solo e sedimentos aquáticos

Transmissão

Ingestão



Ferimento



32

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium botulinum* Patogenia

1. Botulismo alimentar (toxina) 
2. Botulismo infantil (a forma mais comum, coloniza intestino, toxina *in vivo*). 
3. Botulismo de lesão (toxina) 
4. Botulismo inalatório (bioterrorismo) 

33

---

---

---

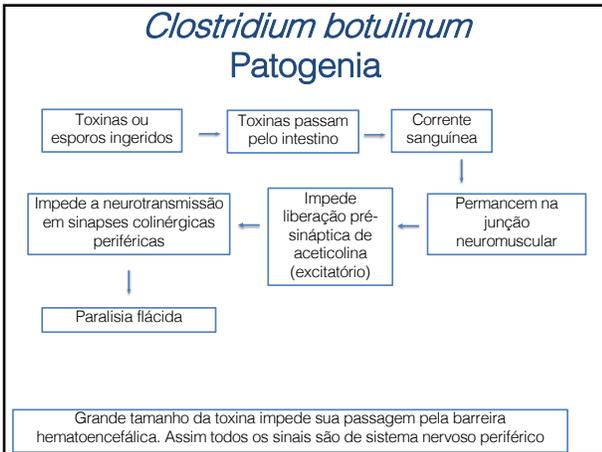
---

---

---

---

---



34

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Clostridium botulinum* Diagnóstico laboratorial

**ELISA (proteína) e PCR (gene) das toxinas A-G**

soro/plasma/tecidos/alimento/conteúdo estomacal fresco/material de vômito

Inoculação intraperitoneal de extrato do material em camundongos

Morte em 3hs a 3 semanas (média de 4 dias), precedida por fraqueza muscular, paralisia de membros e dificuldade respiratória.

**Agar seletivo para *C. botulinum***  
Tripton, dextrose, sais, gema de ovo, antibióticos para inibir crescimento de outras bactérias, indicador de pH

35

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Clostridioses Diagnóstico laboratorial

- Meio de transporte anaeróbico (meio semi-sólido com agentes redutores – tioglicolato e cisteína)
- Indicador resazurina (indica se o meio foi exposto ao oxigênio tornando-se rosa)

36

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Prevenção de clostridioses

- Impossível erradicar (solo, ambiente)
- Vacinação
  - *Clostridium tetani* - toxina

---

---

---

---

---

---

---

---

37

Bacilos G+ aeróbios ou anaeróbios facultativos

---

---

---

---

---

---

---

---

38

*Bacillus* spp

---

---

---

---

---

---

---

---

39

## Características gerais

### Taxonomia

- Ordem *Bacillales*
- Família *Bacillaceae*
- Bacilos gram-positivos, anaeróbios facultativos
- **Produtores de endosporos** (resistência ao calor, dessecação, radiação UV, desinfetantes etc) – permanecem no ambiente por décadas
- Comumente habitam solo e água –  $10^6$ - $10^7$  *Bacillus* spp/grama de solo
- Três espécies patogênicas principais

Espécies patogênicas	Fonte usual ou doença
<i>Bacillus anthracis</i>	Antraz ou Carbúnculo Hemático (zoonose)
<i>B. cereus</i>	Intoxicação alimentar em humanos; infecções oportunistas em animais
<i>B. thuringiensis</i>	Patógeno de insetos

40

---

---

---

---

---

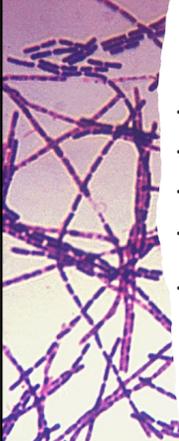
---

---

---

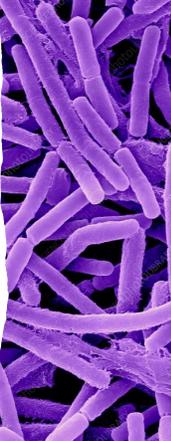
---

---



### Características gerais

- Gram +
- Anaeróbios facultativos
- Endosporos
- Plasmídeos associados à virulência
- Fatores de virulência em espécies patogênicas:
  - B. anthracis* - toxina letal (LeTx), Toxina do edema, cápsula
  - B. cereus* – Toxina emética (cereulida), enterotoxinas



41

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## *Bacillus anthracis*

42

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Características gerais

- Antraz ou Carbúnculo
- Bastonetes gram-positivos retangulares
- Não móveis
- Cadeias de bastonetes
- Cápsula
- Endoesporos são produzidos no interior das células durante condições de privação de nutrientes
- Dois plasmídeos = pXO1 (toxinas) e pXO2 (cápsula)
- Escapam fagolisossomo

43

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Características gerais

- Núcleo do endoesporo = célula bacteriana inerte
- Córtex = camada de peptidoglicano, envolvido pelas camadas proteicas de revestimento interna (*spore coat*) e externa (exosporo)

**Bacterial Endospore**

44

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Características gerais

- Toxina letal (LeTx) - codificada no plasmídeo pXO1
- Toxina do tipo AB (subun.: antígeno protetor, fator letal e fator do edema)
- Fator letal no citosol leva à apoptose (macrófagos e outras células)
- Fator do edema é uma adenilato ciclase - aumenta AMPc - lesões hemorrágicas em múltiplos órgãos, hipotensão e bradicardia

45

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Reservatório e Transmissão

- Em carcaças, bactérias sobrevivem 1-2 semanas, mas endosporos permanecem em ambiente estável por décadas
- Autoclave (121°C, 15 min) mata endosporos; fervura comum não
- Mais resistentes a desinfetantes (topo da pirâmide)
- Solo = fonte de infecção = herbívoros
- Outras espécies, inclusive humanos, são expostos por meio de animais e produtos de origem animal
- Bioterrorismo



46

---

---

---

---

---

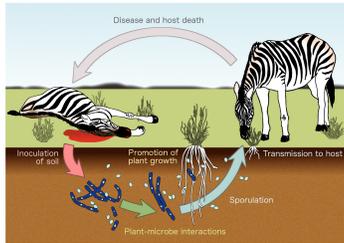
---

---

---

## Reservatório e Transmissão

- Endoesporo = modo de infecção
- Alimento ou água contaminada
- Ferimentos infectados ou picada de artrópodes
- Carcaças de animais infectados contaminam o solo
- Indústrias que manipulam carcaças = curtumes, tecelagem de tapetes



47

---

---

---

---

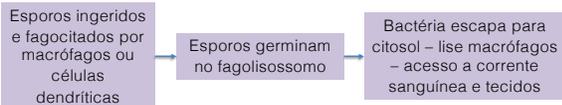
---

---

---

---

## Patogenia e Doença



- Edema gelatinoso, hemorragias
- Lesões semelhantes à outras causas tóxicas e de morte aguda
- Hemorragias disseminadas, baço friável, ausência de coagulação, edemas generalizados, hepatomegalia, esplenomegalia, "rigor mortis" ausente ou incompleto, hemorragia nos orifícios naturais – em condições super-agudas há poucas lesões (dificulta o diagnóstico)

48

---

---

---

---

---

---

---

---

## Patogenia e Doença



### Humanos

- 2 apresentações (depende da porta de entrada):
- 1. Cutânea
  - Inoculação de esporos em ferida
  - 95% dos casos
  - 10-20% de mortalidade
- 2. Pulmonar
  - Inalação dos esporos
  - 50-90% de mortalidade
  - “Doença do classificador de lâ”




---

---

---

---

---

---

---

---

49

## Diagnóstico

- Diferencial: outras doenças também causam morte súbita
- Amostras: sangue, secreções sanguinolentas para exame direto
- Esfregaços de sangue e de órgãos podem ser corados com Gram ou com um corante de cápsula (azul de metileno) – outras espécies de *Bacillus* spp não apresentam cápsula e não possuem aparência rectangular
- Ágar sangue, sem hemólise
- Inoculação em camundongos (morte em 24hs)
- PCR




---

---

---

---

---

---

---

---

50

## Tratamento e prevenção

- Progressão muito rápida – dificulta tratamento, mas antibióticos podem ajudar (não há resistência reportada)
- Pessoas em risco – vacina de filtrado de cultura concentrado (acelular) – cinco aplicações por um período de 18 meses.

---

---

---

---

---

---

---

---

51

# Listeria monocytogenes

52

---

---

---

---

---

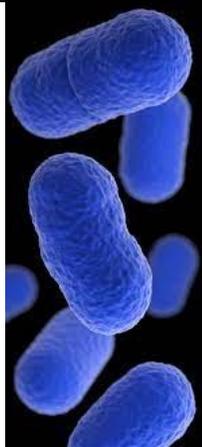
---

---

---

## Características gerais

- Listeriose
  - Pequenos bastonetes gram-positivos
  - Não esporulado
  - Aeróbio a anaeróbio facultativo
  - Não capsulada
  - Intracelular
- 
- Imunocomprometidos
  - Neonatos
  - Idosos
  - Mulheres grávidas



53

---

---

---

---

---

---

---

---

### Who has a greater chance of Listeria infection?



People who are pregnant



People who are 65 years and older



People who have a weakened immune

### Reservatório e Transmissão

- Ubiquitária no ambiente
  - Toda cadeia de alimentos é suscetível a contaminação
  - Mas o mais comum é produtos lácteos não pasteurizados
  - Carne, vegetais não cozidos
  - Consegue se multiplicar na temperatura de refrigerador
- 
- Em mulheres grávidas, a infecção por listeriose costuma ser leve. Porém, pode espalhar-se antes e durante o parto, de mãe para filho, e pode causar aborto espontâneo, natimortos, parto prematuro ou morte precoce do bebê.

54

---

---

---

---

---

---

---

---

## Patogenia e Doença

### Doença invasiva (além do intestino)

- Pessoas grávidas: febre, sintomas tipo gripais (fadiga, dor muscular etc), problemas com a gestação
- Pessoas não grávidas: febre, sintomas tipo gripais (fadiga, dor muscular etc), dor de cabeça, confusão, perda de equilíbrio, tonturas, endocardite, meningite/meningoencefalite em neonatos e pessoas >65 anos, listeriose oculoglandular, sepse

### Doença intestinal

- Normalmente sintomas são leves
- Diarréia
- Vômito
- Pode vir a desenvolver doença invasiva

55

---

---

---

---

---

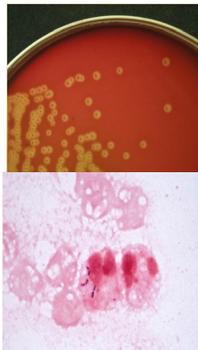
---

---

---

## Diagnóstico

- Cultura bacteriana e PCR
- Amostras: sangue, líquido cefaloraquidiano, placenta
- Sorologia (2-4 semanas após infecção)
- Citologia de LCR
- Meios PALCAM e ALOA para amostras humanas



- Agar de sangue de Columbia fornece os nutrientes e os cofatores.  
 - A seletividade do meio é obtida pela presença de cloreto de lítio, sulfato de polimixina B, acriflavina HCl e ceftazidima, que suprimem o desenvolvimento da maioria das subespécies não pertencentes às *Listeria* presentes nos alimentos e amostras clínicas.

56

---

---

---

---

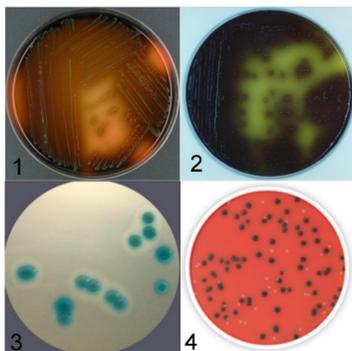
---

---

---

---

Figura 2 - Meios seletivos utilizados para identificar *Listeria monocytogenes*.



1 - PALCAM; 2 - OXFORD; 3 - ALOA; 4 - Rapid L/mono.

57

---

---

---

---

---

---

---

---

## Tratamento e prevenção

- Maioria das pessoas se recuperam da Doença intestinal sem antibióticos
- Doença invasiva – antibióticos (ampicilina ou penicilina G com aminoglicosídeo)
- Prevenção: higiene dos alimentos



58

---

---

---

---

---

---

---

---

Dúvidas?

[anamarcia@usp.br](mailto:anamarcia@usp.br)

59

---

---

---

---

---

---

---

---