

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LUCAS TEIXEIRA SOUZA

***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*: UMA REVISÃO**

Belo Horizonte

2017

LUCAS TEIXEIRA SOUZA

**CLOSTRIDIUM PERFRINGENS E SUAS
PATÔGENIAS EM HUMANOS**

Monografia apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Elisabeth Neumann

Belo Horizonte

RESUMO

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria Gram-positiva ubíqua, muito comum no trato gastrointestinal de humanos e animais. Em algumas situações específicas, certas linhagens podem tornar-se patogênicas para animais, causando grandes prejuízos em âmbitos agropecuários, ou para humanos, causando doenças que variam em gravidade dependendo do tipo de infecção. Esse estudo objetivou realizar um levantamento de dados em torno dessa bactéria com ênfase em aspectos como: história e morfologia além de informações sobre as três maiores doenças relacionadas à *C. perfringens* em humanos: a toxinfecção alimentar, a enterite necrosante e a gangrena gasosa. Foi observado que essa bactéria é de extrema importância para a saúde pública firmando-se como a segunda fonte mais comum de contaminações alimentares nos EUA e a sexta mais comum no Brasil, além de envolvida em infecções hospitalares e de cortes profundos. Sendo assim, faz-se necessária a criação de novas linhas de pesquisa com foco em vacinas, tratamentos e formas de prevenção dessas doenças.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*, contaminação alimentar, toxinfecção, enterite necrosa, gangrena gasosa, *Clostridium*, *Bacillus welchii*

ABSTRACT

Clostridium perfringens is a ubiquitous Gram-positive bacterium, common in the gastrointestinal tract of both humans and animals. In certain circumstances some lineages might become pathogenic to animals, causing losses in the agropecuary segment, or humans, causing different types of diseases that varies in gravity and lethality. This study aimed to raise data in regards of this bacteria with focus on its: history, morphology and information around the three main human afflictions caused by *C. perfringens*: food poisoning, necrotic enteritis and gas gangrene. We showed that this bacteria is extremely important in regard to human health, being the second most common cause of food poisoning in the USA and the sixth most common in Brazil. It is also involved in dangerous hospital infections and deep cut infections. Therefore there is a high demand for the creation of new research around vaccines, treatments and prevention forms for these diseases.

keyword: *Clostridium perfringens*, food poisoning, toxinfection, necrotic enteritis, gas gangrene, *Clostridium*, *Bacillus welchii*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dados de DTA's no Brasil, observa-se que os maiores responsáveis por essas doenças são as bactérias. Fonte: Sinam/SVS	9
Figura 2 – Incidências de DTA's no Brasil classificados por agente etiológico.	11
Figura 3- Clostridium perfringens corado pelo método de Gram. Fonte: (Stalons, 2016)	17
Figura 4 - Segment of jejunum showing mucosal necrosis and pseudomembrane (large arrow) and pneumatosis (small arrow). Fonte: (Gui et al., 2002)	22
Figura 5 – Pústulas necróticas gasos advindas de uma infecção por C. perfringens, Fonte: (Schröpfer et al., 2008)	23
Figura 6 – Corte histológico do músculo de paciente afetado pela gangrena gasosa. Observam-se as inclusões gasosas entre as fibras musculares. Fonte:(Schröpfer et al., 2008)	24
Figura 7 – Ciclo da contaminação alimentar por C. perfringens Adaptado de McLane, 2001	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Toxinas usadas para sorotipagem de *C. perfringens* 18

Tabela 2 - Toxinas presentes em *C. perfringens*. Fonte: (Stiles et al., 2013; Uzal et al., 2014) 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agr – Accessory gene regulator

CDC – Center for Disease Control

CPA – *Clostridium perfringens* Alfa toxin

CPB - *Clostridium perfringens* Beta toxin

CPB - *Clostridium perfringens* Beta toxin 2

CPE - *Clostridium perfringens* Enterotoxin

CPI - *Clostridium perfringens* Iota toxin

DNA – Desoxiribonucleic acid

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

ELISA – Enzyme-linked immuosorbent assay

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

NetB – Necrotic Enteritis type B-like

PFO- Perfringolisina O

PMN – Células polimorfonucleadas

Tpel – Toxin perfringens Large

UFC – Unidade Formadora de Colônia

Sumário

1. Introdução.....	8
1.1 C. perfringens em DTA's	8
1.2. C. perfringens em outras doenças	12
2. Objetivo	13
3. Metodologia.....	14
4. Revisão de literatura	15
4.1. História	15
4.2. Morfologia, fisiologia e ecologia	17
4.3. Doenças causadas por C. perfringens	20
4.3.1. Toxinfecção alimentar.....	20
4.3.2. Enterite necrótica.....	21
4.3.3. Gangrena gasosa (mionecrose)	22
4.4. Diagnostico	24
4.4.1. Toxinfecção alimentar.....	24
4.4.2. Enterite necrótica.....	25
4.4.3. Gangrena gasosa	26
4.5. Patogenia	26
4.5.1. Toxinfecção alimentar.....	26
4.5.2. Enterite necrótica	29
4.5.3. Gangrena gasosa	30
4.6. Controle e tratamento.....	31
4.6.1. Toxinfecção alimentar.....	31
4.6.2. Enterite necrótica.....	32

4.6.3.Gangrena gasosa	32
5.Conclusão	33
6.Referências Bibliográficas	35
Anexo I	42

1. Introdução

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, que pode ser facilmente encontrada em diversos tipos de ambiente (solo, dejetos sólidos, esgotos) além do intestino de diversos animais. Apesar de não ser capaz de invadir células, essa bactéria produz toxinas e enzimas que podem causar doenças tanto intestinais (relacionadas com alimentos) quanto musculares (relacionadas com infecção de feridas).

Essa bactéria é capaz causar doenças em animais como ovelhas, aves, equinos e suínos, representando milhões de dólares em perdas para criadores anualmente. Em seres humanos, *C. perfringens* faz parte da microbiota natural do intestino, porém, em certas circunstâncias pode se tornar patogênico.

As suas formas patogênicas mais comuns em humanos se dividem em 3 tipos: toxinfecção alimentar, enterite necrosante e gangrena gasosa, sendo as duas primeiras relacionadas ao consumo de alimentos contaminados, se enquadrando como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Já a gangrena gasosa é uma infecção muito mais perigosa, que pode evoluir para óbito rapidamente, e está associada a não-desinfecção de feridas profundas.

1.1 *C. perfringens* em DTA's

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) são conhecidas desde épocas muito remotas, acredita-se que uma das primeiras mortes registradas associada a esse tipo de doença data de 323 a.C., com a morte de Alexandre, o Grande, supostamente vítima de febre tifoide (Oldach *et al.*, 1998). Inicialmente essas doenças eram associadas unicamente ao estado de putrefação do alimento, porém, como demonstrado pelo Coronel Robert Gibbon Johnson, em 1820, ao comer um tomate podre em frente a uma plateia durante um encontro de fazendeiros do condado de Salem nos EUA, mostra que o estado de putrefação do alimento não é necessariamente um fator determinante de sua patogenicidade (Roberts, 2001).

No século XIX, durante o percurso dos avanços tecnológicos, surgiram os cientistas pioneiros responsáveis pela associação de doenças com certos tipos de alimentos.

Um grande exemplo foi o Dr. John Snow, que em 1848 descobriu uma associação entre água contaminada e a disseminação da cólera (Roberts, 2001). A partir dessas descobertas, a ciência foi se consolidando até atingirmos o conhecimento que temos hoje de que as DTA's são causadas por microrganismos, compostos químicos e outros tipos de contaminantes.

DTA's podem ser causados por diversos tipos de agentes, sendo estes divididos em biológicos e não-biológicos. Dentre os agentes não biológicos encontram-se toxinas inorgânicas, metais pesados e produtos químicos. Já os biológicos são compostos por fungos, vírus e bactérias. Segundo os dados mais recentes do Ministério da Saúde, 90,5% de todas as DTA's que ocorrem no Brasil são causadas por bactérias (Figura 1). Dentre as bactérias causadoras de doenças em alimentos, uma das que mais se destaca é o *Clostridium perfringens*, sexta causa mais comum de casos de DTA no Brasil e segunda nos EUA e no mundo.

Brasil, 2007 a 2016*

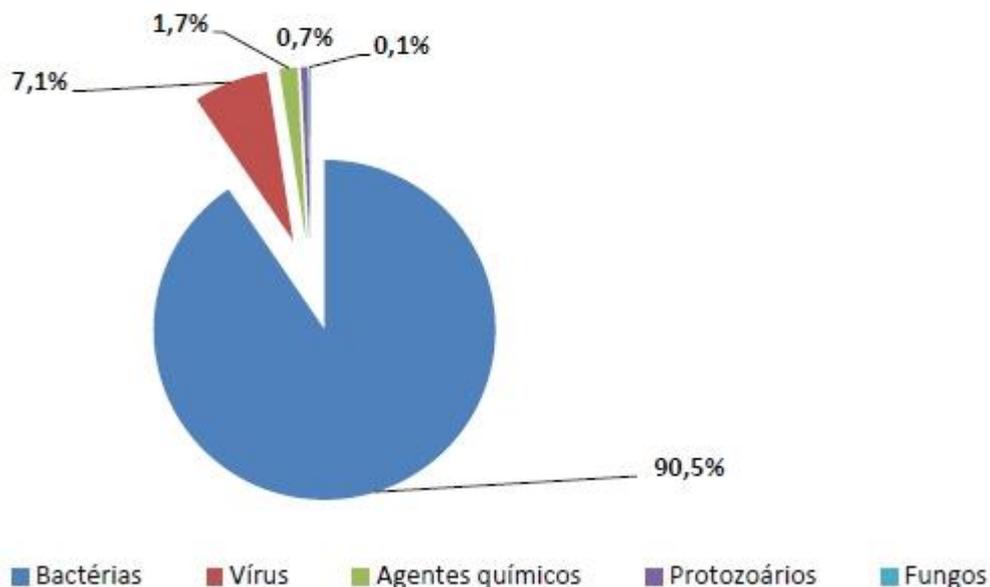


Figura 1 – Dados de DTA's no Brasil, observa-se que os maiores responsáveis por essas doenças são as bactérias. Fonte: Sinam/SVS

No Brasil, entre os anos de 2007 a 2016, 5,7% dos casos de DTA's que tiveram seus agentes etiológicos confirmados foram causados por *C. perfringens*, o que aponta um pequeno aumento, quando comparado com o período 1999 a 2005, no qual apenas 4,5% dos casos foram causados por essa bactéria (Figura 2). Vale ressaltar porém que no Brasil, somente de 30 a 40% dos casos relacionados a DTA's chegam a ter seus agentes etiológicos elucidados, mostrando uma certa ineficiência dos métodos diagnósticos empregados no sistema público de saúde.

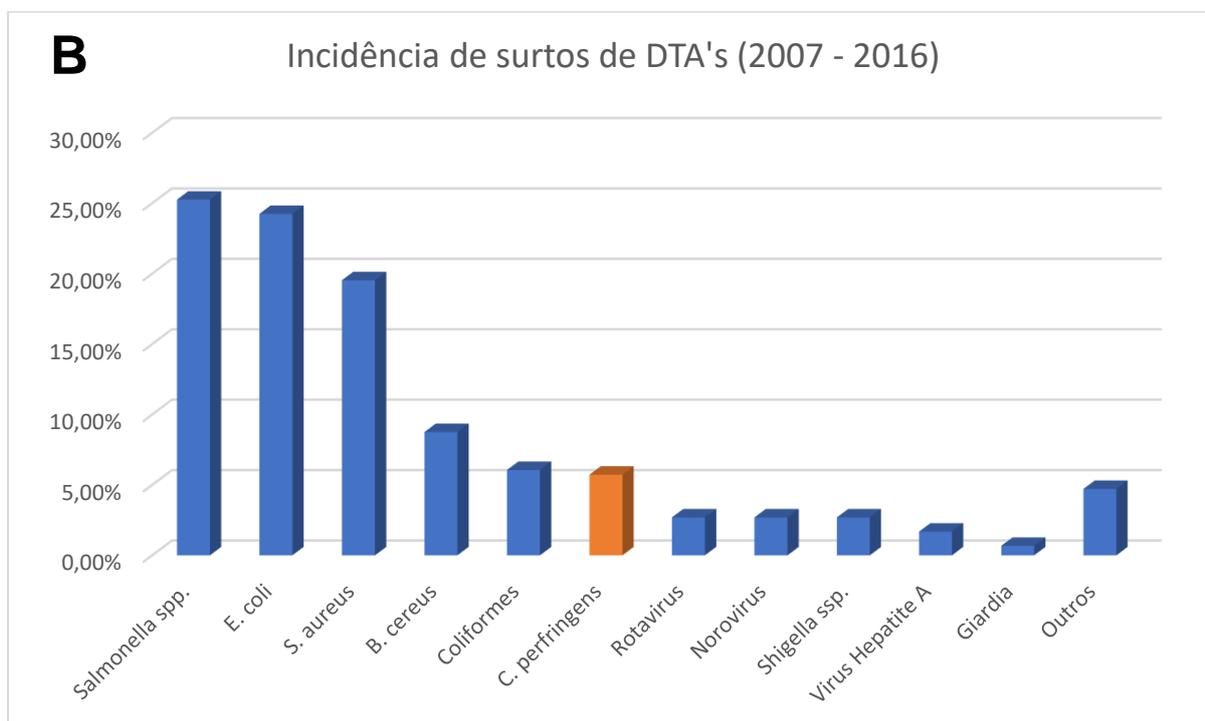
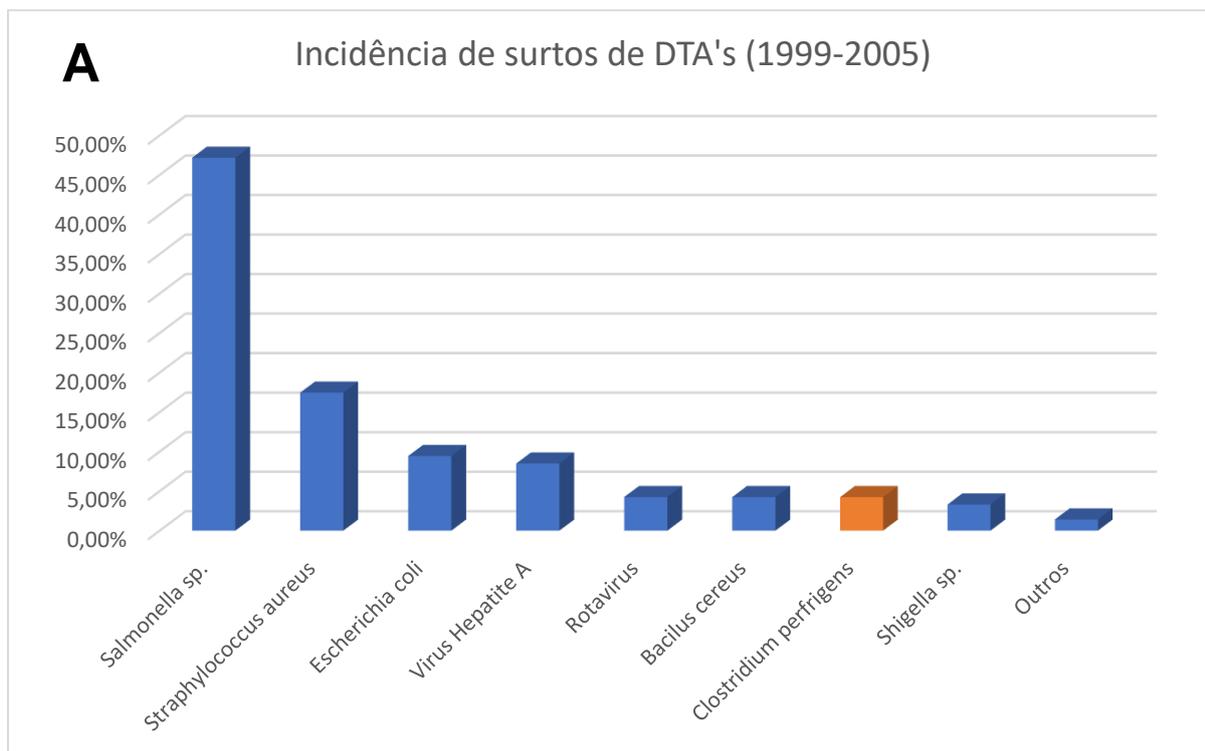


Figura 2 – Incidências de DTA's no Brasil classificados por agente etiológico.

1.2. *C. perfringens* em outras doenças

O papel do *C. perfringens* em infecções não relacionadas a alimentos é representada principalmente por uma infecção muscular profunda denominada gangrena gasosa. Apesar de não ser o único causador desse tipo de infecção, o *C. perfringens* é responsável por mais de 80% dos seus casos.

Apesar de se tratar de uma doença com relativamente baixa incidência (aproximadamente 3000 casos por ano), a sua mortalidade é elevada, variando entre 25 e 100%, dependendo do estado imune do hospedeiro e do nível de excelência e eficiência dos hospitais do país (Stevens *et al.*, 2005).

Os casos dessa patogenia geralmente envolvem a entrada direta de bactérias na corrente sanguínea ou na musculatura do paciente, aonde se instala e inicia seu ciclo de reprodução. Desta forma, casos dessa condição são muito associados a tempos de guerra e uso de drogas injetáveis sem esterilização de seringas.

Diante do potencial patogênico desse microrganismo, faz-se necessária a realização de um levantamento de dados e informações a respeito, principalmente pelo fato de *C. perfringens* ser relativamente pouco conhecida pela população em geral e até mesmo pela comunidade científica. Sendo assim, esse trabalho se propõe a realizar uma revisão dos dados referentes às doenças causadas por *C. perfringens* em humanos e os mecanismos envolvidos nas mesmas.

2. Objetivo

Este estudo se propôs a realizar uma análise de conteúdo das bases de dados bibliográficos enfocando *Clostridium perfringens* e as doenças provocadas por esse microrganismo em humanos.

3. Metodologia

Foi realizado uma revisão bibliográfica extensa na literatura nacional e internacional, utilizando como base os bancos de dados: PubMed, Scielo e periódicos Capes, ordenado pelo agregador Google Scholar. Foram também utilizados de dados disponibilizados pela ANVISA.

4. Revisão de literatura

4.1. História

A bactéria Gram-negativa atualmente identificada como *C.perfringens* foi descrita pela primeira vez no final do século XIX por Welch e Nutall e batizada de *Bacillus aerogenes capsulatus* ou *B. welchii* (Welch e Nuttall, 1892 APUD Lucey e Hutchins, 2004). Essa bactéria foi isolada em uma autópsia de um homem de 38 anos no hospital Johns Hopkins (EUA) em 1891. O paciente apresentava “um tumor grande, pulsante e semicircular na região intraclavicular direita do peito” (Lucey e Hutchins, 2004), que apresentava eventos de ulceração a cada semana no seu último mês de vida. Durante o procedimento Welch diagnosticou o paciente com tuberculose pulmonar crônica, tuberculose miliar aguda além de um aneurisma do arco superior da aorta. Juntamente a isso, foram observadas secreções gasosas sob a pele da área do tumor e posteriormente foram observadas formações de bolhas de gás em várias partes do sistema circulatório do paciente.

Um exame de microscopia do sangue do paciente revelou uma abundante quantidade de bacilos que apresentavam uma forte associação com a formação de gás em diversos órgãos do corpo do paciente. Em um experimento posterior, Welch e colaboradores realizaram uma injeção da bactéria isolada durante essa autópsia em coelhos e observaram que, em condições normais, a bactéria não acarretava a formação de gás no corpo, porém, após a morte do hospedeiro, iniciava-se uma produção extremamente rápida. Welch concluiu então que *Bacillus welchii* não era patogênico em condições normais (Welch e Nuttall, 1892; Lucey e Hutchins, 2004).

Em muitos casos é possível encontrar na literatura desse período ambos os nome *B. welchii* e *B. perfringens*, isso ocorre pois quase simultaneamente aos experimentos de Welch, os pesquisadores franceses Veillon e Zuber descreveram a mesma bactéria sob o nome de *B.perfringens* (Kerr, 1907; Veillon e Zuber, 1989). Atualmente entende-se que Veillon e Zuber identificaram-na primeiro, o que ocasionou a oficialização do nome dessa bactéria como *perfringens*. Para fins didáticos, esse será

o nome utilizado neste estudo desse ponto em diante, mesmo que o trabalho no qual se baseiam as informações utilizem o termo *welchii*.

O *B. perfringens* foi isolado também de fezes de humanos saudáveis poucos anos após a sua descoberta (Kerr, 1907), o que iniciou a ideia de que ele compunha a microbiota intestinal de mamíferos, apresentando efeitos patológicos apenas em situações de desbalanço.

Em 1917, Bull e colaboradores refutaram os resultados obtidos por Welch ao demonstrar que, ao adicionar pequenas porções de tecido muscular estéril aos meios de cultura contendo o *B. perfringens*, observa-se uma toxicidade elevada quando injetada nos animais. A sua ação biológica varia de hemolítica, quando injetado de forma intravenosa, ou necrotizante/inflamatório quando injetado de forma subcutânea (Bull e Pritchett, 1917b). Nesse mesmo estudo observou-se também que, em doses específicas, os indivíduos injetados apresentavam uma resposta imune à bactéria e que o sangue de coelhos e pombos imunizados eram capazes de neutralizar o efeito tóxico da bactéria em outros indivíduos, o que demonstrava a produção de antitoxinas pelo sistema imune (Bull e Pritchett, 1917b). Ainda no mesmo ano, Bull foi capaz de isolar a toxina responsável pela letalidade observada em seu trabalho anterior e identificar que linhagens diferentes da bactéria produzem toxinas com toxicidades que variam até 10 vezes entre si (Bull e Pritchett, 1917a).

Em 1933, Kelly demonstrou uma relação entre casos de gangrena gasosa e infecções pelo *B. perfringens* (Kelly, 1933). Apesar de inicialmente o estudo apresentar um número baixo de indivíduos onde essa relação era presente, posteriormente essa relação foi consolidada e até hoje é observada (Hatheway, 1990).

Com a mudança na classificação bacteriana proposta por Ida A. Bengston, em 1924, foi criado o gênero *Clostridium*, o qual se diferenciava do gênero *Bacillus* por crescer em ambiente anaeróbico. Desde então o *Bacillus perfringens* passou a ser identificado como *Clostridium welchii*, exatamente por ser ineficaz crescendo em ambiente aeróbico (Mclane, 2001; Maczulak, 2011). Apesar disso, a comunidade acadêmica demorou alguns anos para se acostumar com a mudança, o que explica os diversos trabalhos que utilizam o termo *Bacillus* quando o correto seria se referir à

bactéria como *Clostridium welchii*. Além de crescer em ambiente anaeróbico o gênero *Clostridium* é caracterizado por: formar endósporos em formato garrafal e não produzir a enzima catalase (Maczulak, 2011).

4.2.Morfologia, fisiologia e ecologia

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram-positiva que apresenta a conformação de bacilo, com laterais paralelas retas e pontas levemente arredondadas (Figura 3).

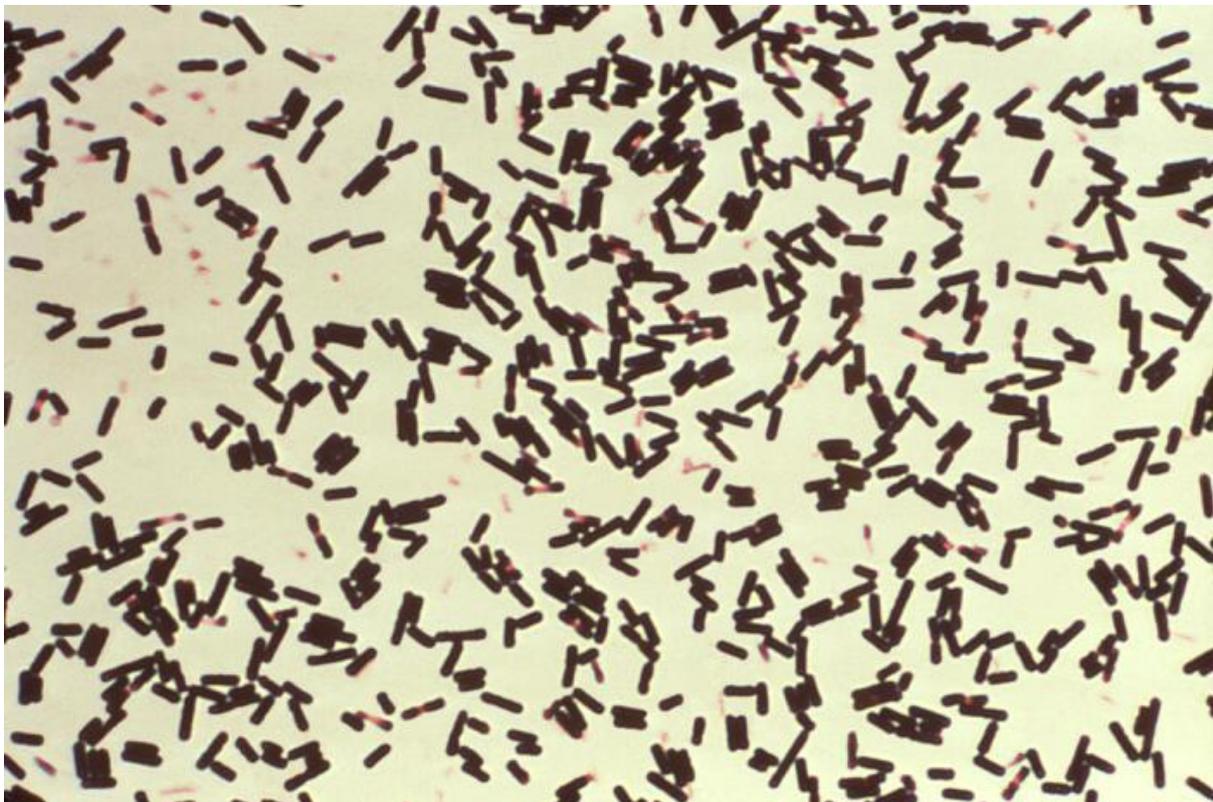


Figura 3- *Clostridium perfringens* corado pelo método de Gram. Fonte: (Stalons, 2016)

Essa bactéria pode ser encontrada em praticamente todos os ambientes do planeta, sendo especialmente prevalente na microbiota intestinal de humanos e animais, solos, vegetação em decomposição e cursos d'água (Matches *et al.*, 1974; Bezirtzoglou *et al.*, 1994; Maheux *et al.*, 2013).

Ela apresenta também uma estrutura capsular formada primariamente por uma cadeia repetitiva de hexassacarídeos, sendo a primeira a apresentar esse tipo de estrutura descrita pela comunidade científica (Kalelkar *et al.*, 1997). Os endósporos, em geral, são posicionados centralmente e, em raras ocasiões, são encontrados também em posição sub-terminal (Raju e Sarker, 2007).

É considerada uma bactéria anaeróbica obrigatória, uma vez que placas de ágar inoculadas com amostras de *C. perfringens* e incubadas em atmosfera de aerobiose não desenvolvem colônias. Apesar disso, ela apresenta uma elevada tolerância à presença de oxigênio, sendo necessária apenas uma pequena redução do potencial oxidante-redutor para que as colônias se desenvolvam (Labbe, 1989; Mclane, 2001; 2003).

Como é uma bactéria anaeróbica e, por consequência, não pode usar o oxigênio como aceptor final de elétrons, o *C.perfringens* utiliza o nitrato. Em ambientes saturados de nitrato, observa-se um grande crescimento na taxa de multiplicação desse organismo (Hasan e Hall, 1975). Ela possui o aparato enzimático para processar as vias metabólicas da glicose e do glicogênio, porém, não possui capacidade de biossíntese de aminoácidos, que impossibilita a sua sobrevivência em meios pobres em aminoácidos (Shimizu *et al.*, 2002).

Clostridium perfringens é subdividido em 5 sorotipos: A,B,C,D e E, baseado nas toxinas extracelulares produzidas, as chamadas toxinas alfa, beta, épsilon e iota (Tabela 1).

Tabela 1 – Toxinas usadas para sorotipagem de *C. perfringens*

Sorotipo de <i>C.perfringens</i>	Toxina produzida			
	α	β	ϵ	I
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Além das 5 toxinas usadas para determinar o sorotipo dessas bactérias, *C. perfringens* produz pelo menos outros 11 tipos de toxinas, fazendo com que seu arsenal conte com ao menos 16 toxinas (tabela 2), algumas extremamente poderosas, o que torna o seu potencial patogênico extremamente alto.

A maioria das toxinas produzidas por essa bactéria possuem um único alvo, a membrana plasmática da célula hospedeira (Uzal *et al.*, 2014).

Tabela 2 - Toxinas presentes em *C. perfringens*. Fonte: (Stiles et al., 2013; Uzal et al., 2014)

Toxina	Nome alternativo	Ação
Alfa (α)	CPA (clostridium perfringens alfa toxin)	Fosfolipase C e esfingomielinase – comunicação celular
Beta (β)	CPB	Formadora de poro de membrana
Epsilon (ϵ)	-	Formadora de poro de membrana
Iota (ι)	CPI	ADP ribosil-transferase
Beta 2	CPB2	Formadora de poro de membrana
Delta (δ)	-	Formadora de poro de membrana
Eta (η)	-	?
Gamma (γ)	-	?
Kappa (κ)	-	Colagenase
Lamda (λ)	-	Protease
Mu (μ)	-	Hialuronidase
Nu (ν)	-	Deoxiribonuclease
Theta (θ)	PFO (perfringolisina O)	Formadora de poro de membrana
Necrotic enteritis type B-like	NetB	Formadora de poro de membrana
Toxin perfringens large	TpeL	Monoglucosil-transferase
NanI, NanJ, NanH		Neuraminidase
Enterotoxina	CPE	Formadora de poro de membrana

4.3. Doenças causadas por *C. perfringens*

As doenças causadas pelo *C. perfringens*, em humanos, geralmente se apresentam em três formas: toxinfecção alimentar, enterite necrótica e gangrena gasosa.

4.3.1. Toxinfecção alimentar

Esse tipo de doença causada pelo *C. perfringens* é a mais prevalente, sendo a sexta DTA causada por bactérias mais prevalente no Brasil e no mundo e a segunda mais

prevalente nos EUA (Grass *et al.*, 2013 (Uzal *et al.*, 2014). Geralmente está relacionada com o sorotipo A de *C. perfringens*.

Os sintomas mais comuns desse tipo de contaminação incluem diarreia e dores abdominais, que têm início de 8 a 16 horas após a ingestão do alimento contaminado, podendo persistir por até 24 horas antes de serem interrompidas naturalmente em indivíduos saudáveis. Apesar de não ser considerado um quadro especialmente grave, em idosos e pessoas com imunidade comprometida pode chegar a ser fatal (McClane, 2001).

Condições de armazenamento e temperaturas impróprias são responsáveis por praticamente todos os casos documentados de contaminação alimentar causados pelo *C. perfringens*, segundo levantamentos realizados em 1997 pelo CDC (Center for Disease Control) dos EUA (Olsen *et al.*, 1993-1997). O mesmo levantamento apontou também que a maioria dos casos de contaminação alimentar causados por essa bactéria ocorrem em instituições onde a comida é servida para muitas pessoas simultaneamente, cada caso afetando em média 50 a 100 pessoas (Olsen *et al.*, 1993-1997). Estima-se, porém, que os casos que são efetivamente reportados e documentados representam uma fração pequena dos reais uma vez que, por ser um acometimento quase sempre brando, os órgãos de controle epidemiológico raramente são notificados.

4.3.2. Enterite necrótica

Esse tipo de doença causada pelo *C. perfringens* é, além de mais rara, muito mais perigosa (Lawrence e Walker, 1976; Johnson e Gerding, 1997). Essa doença é caracterizada por dores abdominais intensas, diarreia com sangue, vômito e obstrução da luz intestinal (Figura 4), sintomas esses que geralmente se manifestam aproximadamente um a dois dias após a ingestão do alimento contaminado. O sorotipo mais comum de *C. perfringens* que ocasiona essa condição é o C.

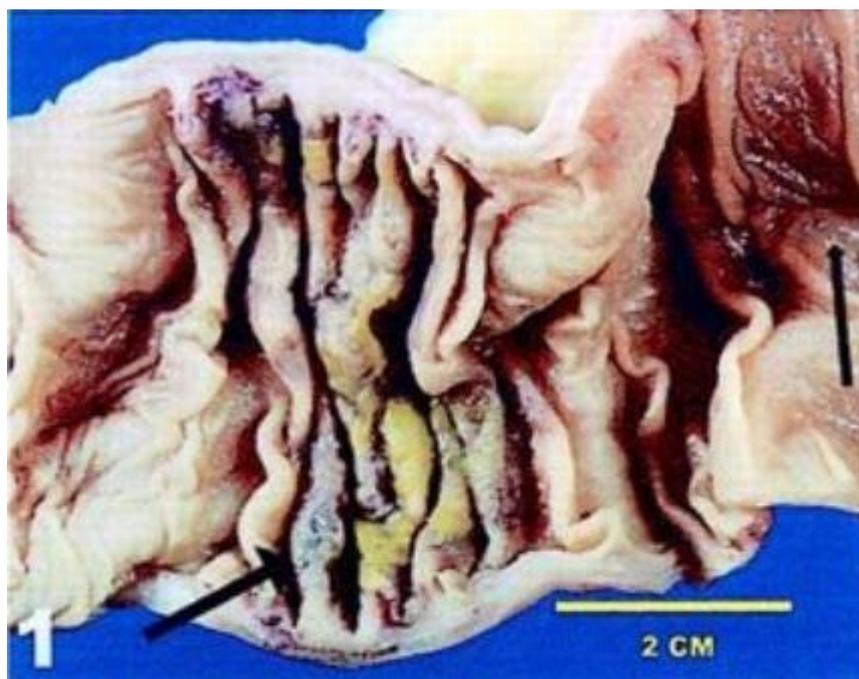


Figura 4 – Segmento de jejuno mostrando necrose mucotica, pseudomembrana e pneumatose Fonte: (Gui et al., 2002)

A enterite necrótica apresenta diversos níveis de gravidade, podendo se resolver sozinha ou, em casos extremos, ser necessário a realização de cirurgias para a remoção da obstrução da mucosa intestinal.

Na maior parte dos casos, os indivíduos acometidos por essa variante apresentam um quadro de subnutrição prévio a exposição bacteriana. Estipula-se que essa subnutrição modifique a composição da microbiota intestinal e permita o desenvolvimento do *C. perfringens* do tipo C (Lawrence e Walker, 1976).

A maior parte das contaminações estão relacionadas ao consumo de carne suína contaminada. Existem áreas nas quais essa condição é endêmica, como por exemplo Papua Nova Guiné, onde é comum em crianças abaixo de 13 anos (Lawrence e Walker, 1976; Mclane, 2001).

4.3.3. Gangrena gasosa (mionecrose)

Essa é a única doença causada por *C. perfringens* que não possui relação com alimentos contaminados pelo microrganismo. A gangrena gasosa decorre da

deposição do *C. perfringens*, mais comumente o sorotipo A, em feridas profundas de mamíferos. Dentro de poucos dias após a contaminação inicial, já é possível observar-se feridas e marcas negras que se formam na região do inoculo devido à natureza necrosante da infecção, além da formação de pústulas gasosas causadas pela produção de gás originada do metabolismo bacteriano (Figuras 5 e 6) (Hatheway, 1990).



Figura 5 – Pústulas necróticas gasos advindas de uma infecção por *C. perfringens*, Fonte: (Schröpfer et al., 2008)

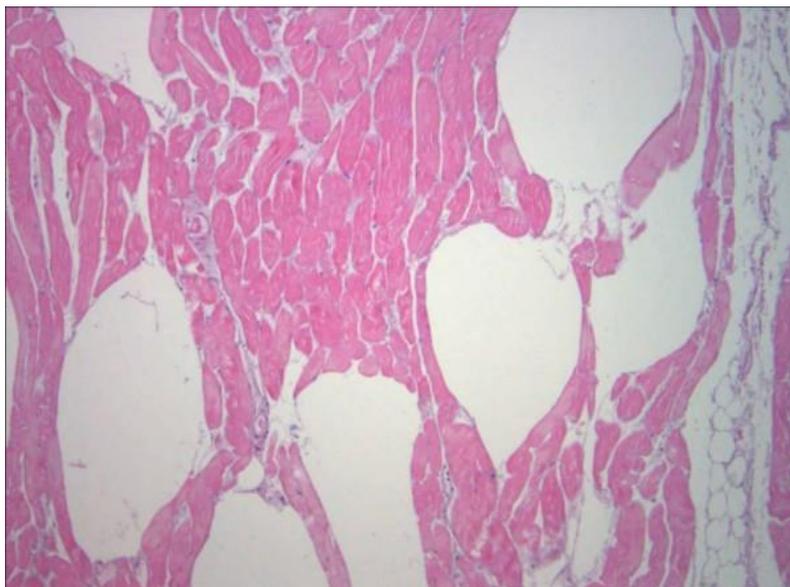


Figura 6 – Corte histológico do músculo de paciente afetado pela gangrena gasosa. Observam-se as inclusões gasosas entre as fibras musculares. Fonte:(Schröpfer et al., 2008)

Este tipo de contaminação está associado a condições precárias de higiene e é comum em tempos de guerra, aonde as alas médicas dificilmente apresentam condições de assepsia suficientes para evitar esse tipo de infecção (Pailler e Labeuu, 1986). Já foram descritos, porém, casos de gangrena gasosa advindos de pós-operatório mesmo em hospitais com os critérios de higiene e biossegurança tidos como adequados, e em usuários de drogas injetáveis (Bryant *et al.*, 2014; Takazawa *et al.*, 2016).

Essa é uma condição extremamente perigosa, na qual a progressão da toxemia é rápida e o risco de choque séptico é alto. Muitas vezes é necessária a realização da amputação/excisão da área afetada (Altemeier e Fullen, 1971).

4.4.Diagnostico

4.4.1.Toxinfecção alimentar

Alguns critérios como: sintomas, tempo de incubação e tipo de alimento são os primeiros a serem analisados na identificação de um surto, porém, como várias intoxicações, infecções e toxinfecções alimentares possuem características clinicas e epidemiológicas similares, abordagens laboratoriais são essenciais para o

estabelecimento do surto por *C. perfringens*. O CDC/EUA e o Ministério da Saúde no Brasil adotam os mesmos critérios como evidências de surto de *C. perfringens* tipo A. Sendo esses confirmados pelos os seguintes testes:

-Demonstração de pelo menos 10^5 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias) da bactéria em fezes de duas ou mais pessoas;

-Demonstração de pelo menos 10^5 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias) da bactéria no alimento suspeito de contaminação;

-Presença de toxinas α ou β nas fezes de vários dos indivíduos com suspeita de contaminação.

Os procedimentos específicos com relação à cultura estão disponíveis no documento *Bacteriological Analytic Manual*, disponibilizado pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA (Anexo I).

A identificação da contaminação também pode ser realizada através de teste de ELISA. É fundamental que uma detecção utilizando esse método seja o mais cedo após o início da diarreia para garantir a maior confiança possível no resultado, uma vez que a bactéria causadora do surto não permanece no organismo por mais do que alguns dias (Bartholomew *et al.*, 1985).

4.4.2. Enterite necrótica

Apesar de ser uma forma muito mais grave de contaminação do que a toxinfecção alimentar, casos de enterite necrótica raramente são diagnosticados e documentados. Isso ocorre devido ao fato de que essa doença geralmente atinge comunidades pobres, rurais e isoladas com pouco ou nenhum acesso a hospitais ou postos de saúde (McLane, 2001).

Quando reconhecida, a enterite necrótica causada por *C. perfringens* é diagnosticada com base em métodos clínicos ou epidemiológicos, levando em consideração: histórico; sintomas; raio-x abdominal, revelando obstruções intestinais; e laparotomia

(incisão para inspeção da cavidade abdominal), que pode revelar necrose na superfície do intestinos (Johnson e Gerding, 1997).

4.4.3. Gangrena gasosa

O diagnóstico da gangrena gasosa é, classicamente, baseado na observação das feridas características da doença. Essas consistem em feridas com colorações bronze, cinza ou roxas, com grande volume de secreção amarronzada, bulbos hemorrágicos, eritema de rápida expansão e, em estágios avançados, crepitação palpável (Altemeier e Fullen, 1971; Hart *et al.*, 1983).

Apesar de consistir em um quadro bastante indicativo de infecção por *C. perfringens*, o diagnóstico diferencial dessa contaminação só pode ser determinado pela coloração de Gram e posterior visualização em microscópio da célula bacteriana a partir de uma drenagem da região da ferida. É importante notar que, por se tratar de uma doença de avanço clínico extremamente rápido, não é possível aguardar resultados de cultura bacteriana antes de iniciar-se o tratamento (Hart *et al.*, 1983).

4.5. Patogenia

4.5.1. Toxinfecção alimentar

Como já mencionado, o principal sorotipo causador dessa forma de doença causada pela contaminação do alimento é o tipo A, em especial aqueles capazes de produzir a *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). No geral, a dose contaminante precisa ser superior a 10^6 células/g de alimento para causar de fato a toxinfecção.

Ao passarem pela acidez estomacal, muitas das células ingeridas morrem, mas uma pequena parcela se mantém e, eventualmente se aloja no intestino delgado aonde inicia o processo de esporulação, que por sua vez é mediado por um mecanismo de *quorum-sensing* representado pelo sistema do *gene acessório regulador* (Agr) (Yu *et al.*, 2017). É durante essa etapa de esporulação que as toxinas entéricas começam a ser expressadas em maior quantidade (Figura 7). O fato das toxinas só passarem a ser produzidas dentro do hospedeiro caracterizam essa condição como uma verdadeira toxinfecção alimentar, e não uma intoxicação, na qual a toxina pode ser

produzida no alimento e a sua ingestão é que causam os sintomas (McLane, 2001; 2003).

Infecção alimentar por *Clostridium perfringens*

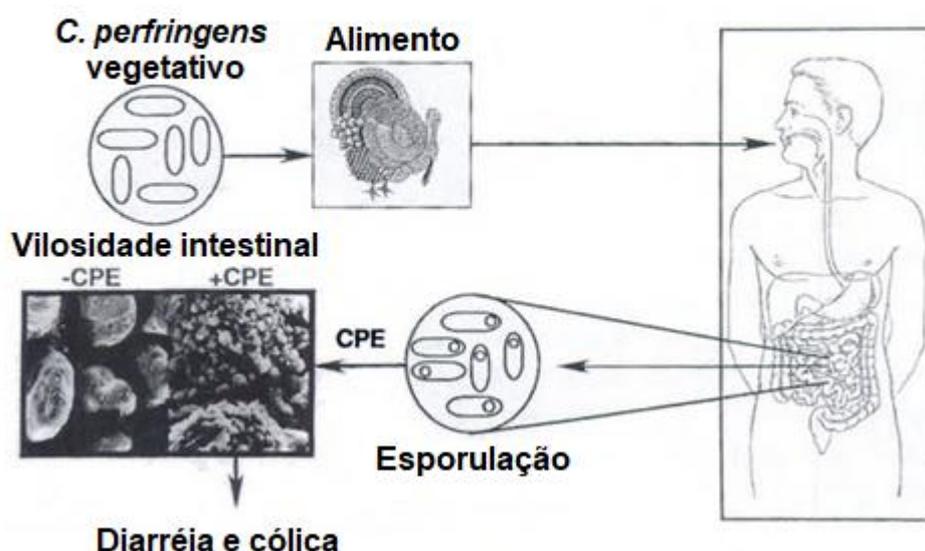


Figura 7 – Ciclo da contaminação alimentar por *C. perfringens* Adaptado de McLane, 2001

Após a sua expressão as toxinas não são imediatamente secretadas, elas se mantem no citoplasma das células em esporulação, muitas vezes formando corpos de inclusão repletos de toxinas. A liberação só ocorre quando os endósporos maduros são liberados através da lise celular ao final do processo de esporulação (Labbe, 1989; McLane, 2001).

Dentre as várias toxinas liberadas, destaca-se a CPE, uma proteína de aproximadamente 35 kDa pertencente à família das aerolisinas formadoras de poros- β , e formada por dois domínios: o C-terminal, responsável pela ligação com receptores; e a N-terminal, responsável pela oligomerização da toxina e formação de poros de membrana (Katahira, Inoue, *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2010; Shrestha e McClane, 2013).

Uma vez liberada no lúmen intestinal a CPE rapidamente se liga a proteínas chamadas claudinas, presentes na mucosa intestinal e fundamentais no mecanismo

de adesão celular do epitélio intestinal (Angelow *et al.*, 2008). Uma vez ligadas, as claudinas e a CPE formam um complexo de aproximadamente 90 kDa (Wnek e McClane, 1983; Wieckowski *et al.*, 1994). Esse complexo se liga então a outro complexo proteico, de tamanho variando entre 135 e 200 kDa, localizado na membrana plasmática das células do hospedeiro e contendo várias proteínas de junção concomitante celular, como as ocludinas e claudinas (Katahira, Sugiyama, *et al.*, 1997).

Uma vez formado esse grande complexo proteico, a CPE transfere uma estrutura chamada β -hairpins transmembrana de seu domínio N-terminal para a célula hospedeira, o que cria um poro na membrana da célula (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). A formação desse poro acarreta uma cascata de efeitos biológicos que:

1) A alteração da permeabilidade da membrana, ocasionando a entrada rápida de moléculas com menos de 200 daltons para o citoplasma celular, acarretando uma morte celular tanto por lise osmótica quanto por desbalanço metabólico.

2) A morte dos enterócitos causada pelo complexo formado pela toxina acarreta um dano histopatológico ao intestino delgado, em especial a descamação do tecido epitelial, que por sua vez acarreta em uma grande perda de fluidos e eletrólitos, causando a diarreia. (McDonel e Duncan, 1977; McDonel e Demers, 1982; Sherman *et al.*, 1994).

O gene *cpe*, associado a produção de CPE está presente em aproximadamente 5% da população de *C. perfringens* tipo A e pode estar presente tanto no DNA cromossomal quanto em plasmídeos (Li *et al.*, 2013).

O papel da CPE nessa forma de patogenia é tido atualmente como essencial. Estudos já foram capazes de demonstrar que a ingestão direta do CPE purificado é capaz de ocasionar efeitos idênticos aos observados em casos de contaminação alimentar causada por *C. perfringens*. Além disso, bactérias mutantes *cpe*- null inoculadas em animais não foram capazes de causar dano histopatológico (Sarker *et al.*, 1999).

Dentre as características que tornam esse tipo de contaminação mais comum e difícil de se prevenir destaca-se a sua resistência ao calor. Os esporos de *C. perfringens* do sorotipo A, capazes de infectar humanos, sobrevivem até 30 minutos em água

fervente, enquanto as bactérias que não produzem CPE, e são portanto incapazes de causar patologias em humanos, sobrevivem por apenas 1 minuto. Assim como quando mantidas a 55°C, as células infectantes sobrevivem o dobro de tempo quando comparadas às não infectantes. Estudos indicam que essa relação entre resistência ao calor e produção de CPE esteja relacionada à incorporação do gene *cpe* ao cromossomo bacteriano, que é facilitada pelo aumento da temperatura em células que possuem o mecanismo de resistência. Acredita-se que a alta frequência de resistência a calor dentre as células produtoras de CPE seja resultado da incorporação de plasmídeos no decorrer de um grande período de tempo (Sarker, Shivers, *et al.*, 2000; Sarker, Singh, *et al.*, 2000).

4.5.2. Enterite necrótica

A enterite necrótica inicia-se após a instalação da bactéria na parede intestinal, seguida da sua multiplicação e produção da toxina- β . Essa toxina afeta diretamente o epitélio do duodeno, jejuno, íleo, e cólon, aonde causa retenção de líquido, necrose e hemorragia grave (Fisher *et al.*, 2006). Após a formação de feridas no epitélio, a toxina- β é capaz de atingir a circulação, possibilitando sua ação em todo o corpo, inclusive no cérebro (Fisher *et al.*, 2006; Uzal e McClane, 2011).

O mecanismo de ação da toxina- β ainda não é completamente conhecido. Sabe-se que é uma proteína indutora de poros de membrana, mas o seu receptor celular específico ainda é desconhecido. Uma vez conectada ao seu receptor, a toxina passa por um processo de oligomerização em hexâmeros ou heptâmeros, criando poros transmembrana (Nagahama *et al.*, 2003). A formação desses poros permite a passagem indiscriminada de ions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- , o que causa uma invasão de água na célula, rompendo-a e causando necrose (Autheman *et al.*, 2013).

O gene associado a produção da toxina- β , o *cpb*, é geralmente carregado por plasmídeos de tamanhos entre 65 a 110 kb. A proteína possui 337 aminoácidos com uma similaridade de 20-28% com toxinas formadoras de poro encontradas em estafilococos e 38% com a toxina NetB, também produzida pelo *C. perfringens* (Uzal *et al.*, 2010). A utilização de formas purificadas da toxina- β em modelos animais é capaz de recriar os efeitos da enterite necrótica no intestino de coelhos e

camundongos (Nagahama *et al.*, 2003), o que juntamente ao fato de linhagens de *C. perfringens* com mutações deletérias no gene *cpb* serem avirulentas em modelos de coelhos, camundongos e cabras (Sayeed *et al.*, 2008; Uzal *et al.*, 2009), confirmam o papel fundamental dessa toxina na enterite necrótica.

4.5.3. Gangrena gasosa

A gangrena gasosa é um acometimento resultante da atividade enzimática da toxina- α , um polipeptídeo único com dois domínios: N-terminal com ligação de zinco, responsável pelas atividades de fosfolipase C e esfingomielinase; e a C-terminal com ligação de cálcio, responsável pela ligação da toxina à membrana celular (Oda *et al.*, 2012; Uzal *et al.*, 2014).

A presença da toxina- α é fundamental para o desenvolvimento da doença. Em modelos animais já foi demonstrado que a infecção por *C. perfringens* com o gene *cpa* (responsável pela produção da toxina- α) silenciado não resulta em doença. A mesma conclusão pode ser tomada também a partir de estudos envolvendo a inoculação de animais com uma forma purificada e levemente modificada da toxina α , que gera uma imunização do mesmo e o não desenvolvimento da gangrena gasosa em modelo animal (Williamson e Titball, 1993; Awad *et al.*, 1995; Uzal *et al.*, 2014).

Um importante fator de virulência, fundamental para a atividade dessa toxina é a Perfringolisina O (PFO), uma citolisina dependente de colesterol, capaz de formar poros na membrana plasmática, essa toxina age sinergicamente à toxina- α (Awad *et al.*, 2001; Chakravorty *et al.*, 2014). Essa sinergia advém do fato da ação da toxina- α na membrana facilitar a interação do PFO com o colesterol presente na bicamada lipídica (Moe e Heuck, 2010; Uzal *et al.*, 2014). Quando em conjunto, a toxina- α e a PFO induzem uma oclusão vascular das células, o que bloqueia o fluxo sanguíneo e acarreta na formação de uma zona isquêmica. Além disso, a oclusão vascular também ocasiona um quadro de leucoestasia, que significa que os leucócitos não conseguem se movimentar livremente

Um fator de extrema importância nesse tipo de infecção Clostridial é a redução da contagem de leucócitos polimorfonucleados (PMNs) (Awad *et al.*, 2001). Esse tipo

extremamente especializado de granulócito é fundamental na resposta imune inata contra infecções bacterianas (Schmidt *et al.*, 2011). *Clostridium perfringens* é capaz de induzir leucoestase vascular, bloqueando o processo de diapedese de PMNs e reduzindo drasticamente a capacidade do sistema imune de lidar com as bactérias infectantes.

Além de sua capacidade de gerar um ambiente leucostático, algumas linhagens *C. perfringens* possuem uma característica que as tornam extremamente difíceis de se lidar; mesmo em pessoas imunocompetentes, elas possuem a habilidade de sobreviver no interior de macrófagos. Isso é possível devido a habilidade dessas linhagens de escapar do fagossomo e migrar para o citoplasma dos macrófagos, sendo eventualmente liberado no ambiente. Acredita-se que o mecanismo responsável por esse comportamento deve-se à presença de duas toxinas: a toxina- α e a PFO que, em conjunto rompem a membrana do fagossomo através da formação de poros na mesma (O'brien e Melville, 2000).

4.6. Controle e tratamento

4.6.1. Toxinfecção alimentar

O método de controle de toxinfecção de *C. perfringens* é, sem dúvidas, a prevenção/redução da contaminação de alimentos com as linhagens infectantes do sorotipo A da bactéria. Essa prevenção se apresenta na forma de: a) cozimento completo dos alimentos, principalmente alimentos grandes, aonde é difícil de se obter uma temperatura alta na porção interior do preparado; b) higienização frequente das mãos dos preparadores e utensílios usados na manipulação dos alimentos; c) refrigeração rápida após o cozimento dos alimentos que não serão consumidos imediatamente, dessa forma o crescimento das células vegetativas de *C. perfringens* é estagnado, impedindo que alcancem uma quantidade infectante de células (Mclane, 2001).

Por se tratar de um acometimento que se resolve sozinho dentro de 12-24 horas, na maioria dos casos o tratamento das infecções alimentares causadas pelo sorotipo A

é exclusivamente sintomática, não sendo necessário o uso de medicamentos ou outros procedimentos médicos (Mclane, 2001).

4.6.2. Enterite necrótica

Mecanismos de imunização contra a toxina β , produzida pelo sorotipo C de *C. perfringens* e responsável pela enterite necrótica são conhecidos desde a década de 90. Quando foi introduzida na região endêmica de Papua Nova Guiné, observou-se uma queda de aproximadamente 80% da quantidade de casos, confirmando a sua efetividade (Lawrence, 1997). Infelizmente por se tratarem de zonas bastante pobres, as áreas endêmicas à enterite necrótica não possuem nenhum programa organizado de imunização coletiva.

Casos em estágios avançados da doença geralmente requerem a utilização de um tratamento combinado de antibióticos variados (penicilina, cloranfenicol, metronidazol, dentre outros) além de intervenções cirúrgicas para remoção de tecido necrosado e obstruções intestinais (Johnson e Gerding, 1997).

4.6.3. Gangrena gasosa

A progressão acelerada da doença limita as possibilidades de tratamentos para essa forma de contaminação causada por *C. perfringens*. O controle da infecção é feito com base em antibióticos, seguido de excisão do tecido infectado ou amputação. A administração de analgésicos também é fundamental, sendo os opioides os mais utilizados, em especial a morfina e a buprenorfina.

Segundo estudos realizados em 2014, a administração de opioides, além de ser fundamental no controle da dor advinda da gangrena gasosa, funciona também como uma medida de controle da progressão da doença. Acredita-se que essas substâncias modifiquem o tráfego celular, modulando os conteúdos de citocinas e quimiocinas no local infectado. Essa mudança permite com que as PMNs ultrapassem a barreira leucostática criada pela infecção de *C. perfringens* e alcance as células bacterianas, reduzindo drasticamente o seu número de células bacterianas presentes na região (Chakravorty *et al.*, 2014).

5. Conclusão

Conforme foi observado durante a revisão de artigos científicos em torno do *Clostridium perfringens* e as suas patogenias em humanos, existe atualmente uma quantidade razoável de estudos acerca do tema. Apesar disso, as infecções causadas por essa bactéria continuam a ser relativamente comuns, tanto em países subdesenvolvidos quanto desenvolvidos.

A forma mais comum de contaminação é, sem dúvidas, advinda do mal preparo dos alimentos, associado ao fato de algumas linhagens patogênicas de *C. perfringens* serem altamente resistentes ao processo mais comum de desinfecção de alimentos, o cozimento. Sendo assim, é de extrema importância a criação de novos métodos capazes de eliminar essa bactéria dos alimentos sem que seja preciso um processo de cozimento muito drástico e que também não altere as propriedades organolépticas do material.

Uma das possibilidades existentes é a combinação de vários métodos de esterilização juntos, por exemplo a combinação da elevação de temperatura juntamente a irradiação do alimento antes da sua distribuição para a população pode ser uma alternativa, apesar de serem necessários estudos que confirmem a sua viabilidade.

Outro problema em relação a *C. perfringens* diz respeito as áreas em que a enterite necrótica é endêmica (Papua Nova Guiné, algumas ilhas da Indonésia e das Filipinas). Por se tratar de uma área bastante pobre, a imunização através das vacinas disponíveis atualmente não é possível, além disso o consumo de carne suína malpassada é um costume associado a cerimônias ritualísticas.

Desta forma a criação de vacinas com preços mais acessíveis é fundamental para a interrupção dessa doença potencialmente letal na área. É função dos cientistas também informar a população dos perigos da ingestão de carne malpassada, principalmente em uma região que sabidamente sofre de contaminações constantes causadas por *C. perfringens*.

A gangrena gasosa, apesar de ser a manifestação mais letal das infecções de *C. perfringens* em humanos, é também a menos comum, tendo uma incidência bastante

baixa na maioria dos países. Ainda assim, por se tratar de um organismo ubíquo e com uma condição de avanço extremamente rápida, a existência de casos de gangrena gasosa causadas por *C. perfringens* dificilmente vai ser completamente eliminada. Faz-se necessário então a pesquisa de novos métodos de controle da doença que impeçam ou retardem o seu progresso, tais como o uso de novos tipos de antibióticos ou substâncias capazes de inibir a ação das toxinas envolvidas no processo.

6.Referências Bibliográficas

ALTEMEIER, W. A.; FULLEN, W. D. Prevention and treatment of gas gangrene. **JAMA**, v. 217, n. 6, p. 806-13, Aug 1971. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5109333> >.

ANGELOW, S.; AHLSTROM, R.; YU, A. S. Biology of claudins. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 295, n. 4, p. F867-76, Oct 2008. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480174> >.

AUTHEMAN, D. et al. Clostridium perfringens beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64644, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23734212> >.

AWAD, M. M. et al. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene. **Mol Microbiol**, v. 15, n. 2, p. 191-202, Jan 1995. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7746141> >.

AWAD, M.M. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7904-10, Dec 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705975> >.

BARTHOLOMEW, B. A. et al. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for Clostridium perfringens type A enterotoxin. **J Clin Pathol**, v. 38, n. 2, p. 222-8, Feb 1985. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2857184> >.

BEZIRTOGLOU, E. et al. Distribution of Clostridium perfringens in different aquatic environments in Greece. **Microbiol Res**, v. 149, n. 2, p. 129-34, Jun 1994. ISSN 0944-5013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7921894> >.

BRIGGS, D. C. et al. Structure of the food-poisoning Clostridium perfringens enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. **J Mol Biol**, v. 413, n. 1, p. 138-49, Oct 2011. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839091> >.

BRYANT, A.; ALDAPE, M.; STEVENS, D. Clostridium perfringens and Other Life-Threatening Clostridial Soft Tissue Infections . In: (Ed.). **Molecular Medical Microbiology: Second Edition**: Elsevier Ltd, v.Vol. 2-3,, 2014. p.pp. 899-907.

BULL, C. G.; PRITCHETT, I. W. IDENTITY OF THE TOXINS OF DIFFERENT STRAINS OF BACILLUS WELCHII AND FACTORS INFLUENCING THEIR PRODUCTION IN VITRO. **J Exp Med**, v. 26, n. 6,

p. 867-83, Dec 1917a. ISSN 0022-1007. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19868189> >.

BULL, C.G. TOXIN AND ANTITOXIN OF AND PROTECTIVE INOCULATION AGAINST BACILLUS WELCHII. **J Exp Med**, v. 26, n. 1, p. 119-38, Jul 1917b. ISSN 0022-1007. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19868130> >.

CHAKRAVORTY, A. et al. Opioid analgesics stop the development of clostridial gas gangrene. **J Infect Dis**, v. 210, n. 3, p. 483-92, Aug 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550443> >.

FISHER, D. J. et al. Dissecting the contributions of Clostridium perfringens type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. **Infect Immun**, v. 74, n. 9, p. 5200-10, Sep 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926413> >.

GRASS, J. E.; GOULD, L. H.; MAHON, B. E. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by Clostridium perfringens, United States, 1998-2010. **Foodborne Pathog Dis**, v. 10, n. 2, p. 131-6, Feb 2013. ISSN 1556-7125. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23379281> >.

GUI, L. et al. Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult. **Mod Pathol**, v. 15, n. 1, p. 66-70, Jan 2002. ISSN 0893-3952. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796843> >.

HART, G. B.; LAMB, R. C.; STRAUSS, M. B. Gas gangrene. **J Trauma**, v. 23, n. 11, p. 991-1000, Nov 1983. ISSN 0022-5282. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6355502> >.

HASAN, S. M.; HALL, J. B. The physiological function of nitrate reduction in Clostridium perfringens. **J Gen Microbiol**, v. 87, n. 1, p. 120-8, Mar 1975. ISSN 0022-1287. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/166143> >.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, n. 1, p. 66-98, Jan 1990. ISSN 0893-8512. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404569> >.

JOHNSON, S.; GERDING, D. Enterotoxemic Infections. In: ROOD, J.; MCLANE, B., et al (Ed.). **The Clostridia**: Elsevier BV, 1997. p.117 - 140.

KALELKAR, S. et al. Structure of the capsular polysaccharide of Clostridium perfringens Hobbs 5 as determined by NMR spectroscopy. **Carbohydr Res**, v. 299, n. 3, p. 119-28, Apr 1997. ISSN 0008-6215. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163894> >.

KATAHIRA, J. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. **J Cell Biol**, v. 136, n. 6, p. 1239-47, Mar 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087440> >.

KATAHIRA, J. Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. **J Biol Chem**, v. 272, n. 42, p. 26652-8, Oct 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334247> >.

KELLY, J. **The X-RAY as an aid in the treatment of gas gangrene. *Bacillus welchii* infection - preliminary report.** Radiology: Radiology Society of North America. 20: 296-301 p. 1933.

KERR, J. **The *Bacillus welchii* (*Bacillus aerogenes capsulatus*) isolated from the human intestine.** University of Illinois: University of Illinois 1907.

KITADOKORO, K. et al. Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. **J Biol Chem**, v. 286, n. 22, p. 19549-55, Jun 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489981> >.

LABBE, R. *Clostridium perfringens*. In: DOYLE, M. (Ed.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker: Marcel Dekker, 1989. p.192-234.

LAWRENCE, G. The Pathogenesis of Enteritis Necroticans. In: ROODS, J.;MCLANE, B., et al (Ed.). **Clostridia: Molecular Genetics and Pathogenesis**. London: Academic Press, 1997. p.198-207.

LAWRENCE, G.; WALKER, P. D. Pathogenesis of enteritis necroticans in Papua New Guinea. **Lancet**, v. 1, n. 7951, p. 125-6, Jan 1976. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/54640> >.

LI, J. et al. Toxin plasmids of Clostridium perfringens. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 77, n. 2, p. 208-33, Jun 2013. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23699255> >.

LUCEY, B. P.; HUTCHINS, G. M. William H. Welch, MD, and the discovery of Bacillus welchii. **Arch Pathol Lab Med**, v. 128, n. 10, p. 1193-5, Oct 2004. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15387691> >.

MACZULAK. **Clostridium**. *Encyclopedia of Microbiology*: Facts on File: 168-173 p. 2011.

MAHEUX, A. F. et al. Abilities of the mCP Agar method and CRENAME alpha toxin-specific real-time PCR assay to detect Clostridium perfringens spores in drinking water. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 24, p. 7654-61, Dec 2013. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077714> >.

MATCHES, J. R.; LISTON, J.; CURRAN, D. Clostridium perfringens in the environment. **Appl Microbiol**, v. 28, n. 4, p. 655-60, Oct 1974. ISSN 0003-6919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4371684> >.

MCDONEL, J. L.; DEMERS, G. W. In vivo effects of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A in the rabbit colon: binding vs. biologic activity. **J Infect Dis**, v. 145, n. 4, p. 490-4, Apr 1982. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6279735> >.

MCDONEL, J. L.; DUNCAN, C. L. Regional localization of activity of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in the rabbit ileum, jejunum, and duodenum. **J Infect Dis**, v. 136, n. 5, p. 661-6, Nov 1977. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/199674> >.

MCLANE, B. *Clostridium perfringens*. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L., *et al* (Ed.). **Food Microbiology: Fundamental and Frontiers**. 2nd. Washington, DS: ASM Press: ASM Press, 2001. p.351-372.

MCLANE, B. *Clostridium perfringens*. In: MILIOTIS, M. e BIER, J. (Ed.). **International handbook of Foodborne Pathogens**: Marcel Dekker, 2003. cap. 6, p.91-104.

MOE, P. C.; HEUCK, A. P. Phospholipid hydrolysis caused by *Clostridium perfringens* α -toxin facilitates the targeting of perfringolysin O to membrane bilayers. **Biochemistry**, v. 49, n. 44, p. 9498-507, Nov 2010. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886855> >.

NAGAHAMA, M. *et al*. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 38, p. 36934-41, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851396> >.

O'BRIEN, D. K.; MELVILLE, S. B. The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. **Cell Microbiol**, v. 2, n. 6, p. 505-19, Dec 2000. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207604> >.

ODA, M. *et al*. *Clostridium perfringens* alpha-toxin recognizes the GM1a-TrkA complex. **J Biol Chem**, v. 287, n. 39, p. 33070-9, Sep 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847002> >.

OLDACH, D. W. *et al*. A mysterious death. **N Engl J Med**, v. 338, n. 24, p. 1764-9, Jun 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625631> >.

OLSEN, S. *et al*. **Surveillance for Foodborne Diseases**. Center for Disease Control (CDC) - United States: Morbidity and Mortality Weekly Report (*MMWR*) 1993-1997.

PAILLER, J. L.; LABEEU, F. [Gas gangrene: a military disease?]. **Acta Chir Belg**, v. 86, n. 2, p. 63-71, 1986 Mar-Apr 1986. ISSN 0001-5458. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3716723> >.

RAJU, D.; SARKER, M. R. Production of small, acid-soluble spore proteins in *Clostridium perfringens* nonfoodborne gastrointestinal disease isolates. **Can J Microbiol**, v. 53, n. 4, p.

514-8, Apr 2007. ISSN 0008-4166. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612607> >.

ROBERTS, C. A. **The Food Safety Information Handbook**. Oryx Press, 2001.

ROBERTSON, S. L.; SMEDLEY, J. G.; MCCLANE, B. A. Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of Clostridium perfringens enterotoxin. **Infect Immun**, v. 78, n. 1, p. 505-17, Jan 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884339> >.

SARKER, M. R.; CARMAN, R. J.; MCCLANE, B. A. Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive C. perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. **Mol Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 946-58, Sep 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10476029> >.

SARKER, M. R. et al. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of Clostridium perfringens isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 8, p. 3234-40, Aug 2000. ISSN 0099-2240. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919775> >.

SARKER, M. R.; SINGH, U.; MCCLANE, B. A. An update on Clostridium perfringens enterotoxin. **J Nat Toxins**, v. 9, n. 3, p. 251-66, Aug 2000. ISSN 1058-8108. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10994528> >.

SAYEED, S. et al. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of Clostridium perfringens type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. **Mol Microbiol**, v. 67, n. 1, p. 15-30, Jan 2008. ISSN 0950-382X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078439> >.

SCHMIDT, E. P. et al. On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity. **Physiology (Bethesda)**, v. 26, n. 5, p. 334-47, Oct 2011. ISSN 1548-9221. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013192> >.

SCHRÖPFER, E.; RAUTHE, S.; MEYER, T. Diagnosis and misdiagnosis of necrotizing soft tissue infections: three case reports. **Cases J**, v. 1, n. 1, p. 252, Oct 2008. ISSN 1757-1626. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937845> >.

SHERMAN, S.; KLEIN, E.; MCCLANE, B. A. Clostridium perfringens type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. **J Diarrhoeal Dis Res**, v. 12, n. 3, p. 200-7, Sep 1994. ISSN 0253-8768. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7868827> >.

SHIMIZU, T. et al. Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 2, p. 996-1001, Jan 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792842> >.

SHRESTHA, A.; MCCLANE, B. A. Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of Clostridium perfringens enterotoxin. **MBio**, v. 4, n. 1, Jan 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322640> >.

STALONS, D. Public Health Image Library, ID#11196. Public Health Image Library, 2016. Disponível em: < <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=11196> >. Acesso em: 19/10/2017.

STEVENS, D. L. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 10, p. 1373-406, Nov 2005. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231249> >.

STILES, B. G. et al. Clostridium perfringens epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man? **Toxins (Basel)**, v. 5, n. 11, p. 2138-60, Nov 2013. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284826> >.

TAKAZAWA, T. et al. A case of acute onset postoperative gas gangrene caused by Clostridium perfringens. **BMC Res Notes**, v. 9, p. 385, Aug 2016. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27488346> >.

UZAL, F. A. et al. Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease. **Future Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 361-77, 2014. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762309> >.

UZAL, F. A.; MCCLANE, B. A. Recent progress in understanding the pathogenesis of Clostridium perfringens type C infections. **Vet Microbiol**, v. 153, n. 1-2, p. 37-43, Nov 2011. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420802> >.

UZAL, F. A. et al. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of Clostridium perfringens type C Enterotoxemias. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5291-9, Dec 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805537> >.

UZAL, F.A. Clostridium Perfringens Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. **Open Toxinology J**, v. 2, p. 24-42, 2010. ISSN 1875-4147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511335> >.

VEILLON; ZUBER. **Recherches sur quelques microbes anaerobies et sur leur role en pathologie**: Archives de medecine experimentale. 10: 517-545 p. 1989.

WELCH, W.; NUTTALL, G. **A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulars*, nov. spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death**. Bull Johns Hopkins Hosp: Bull Johns Hopkins Hosp. 3: 81-91 p. 1892.

WIECKOWSKI, E. U.; WNEK, A. P.; MCCLANE, B. A. Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound Clostridium perfringens enterotoxin. **J Biol Chem**, v. 269,

n. 14, p. 10838-48, Apr 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144671> >.

WILLIAMSON, E. D.; TITBALL, R. W. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. **Vaccine**, v. 11, n. 12, p. 1253-8, Sep 1993. ISSN 0264-410X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8256506> >.

WNEK, A. P.; MCCLANE, B. A. Identification of a 50,000 Mr protein from rabbit brush border membranes that binds *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 112, n. 3, p. 1099-105, May 1983. ISSN 0006-291X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6303335> >.

YU, Q. et al. The Agr-Like Quorum Sensing System Is Required for Pathogenesis of Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens* in Poultry. **Infect Immun**, v. 85, n. 6, Jun 2017. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28373356> >.

7. Anexo

Anexo I

Traduzido de Bacteriological Analytical Manual Capitulo 16: *Clostridium perfringens*, disponibilizado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA.

A. Amostragem:

Deve ser usado a porção inteira do alimento ou, na impossibilidade de tal, devem ser coletadas 25g de diferentes porções do alimento pois a contaminação pode estar distribuída de maneira não uniforme.

B. Transporte e armazenamento das amostras

Transporte e examine imediatamente, sem congelar as amostras, quando possível, mantendo-as a temperatura de 10°C até a conclusão dos exames. Se não for possível iniciar a análise em até 8 horas após a coleta, tratar com solução tampão estéril de sal-glicerina e armazenar imediatamente a -60°C até -70°C e transportar para laboratório em gelo seco.

O descongelamento deve ser feito em temperatura ambiente e posteriormente transferidas juntamente com a solução tampão a um blender estéril. Adicione 200ml de solução de diluição peptonado ao blender e prossiga com a examinação.

C. Métodos de cultura para enumeração e identificação de *Clostridium perfringens* em alimentos

Equipamentos e materiais

1. Pipetas, 1ml (com graduação de 0,1ml), e 10ml (com graduação de 1 ml)
2. Contador de colônias
3. Blender de alta velocidade, e jarra de 1 L de vidro ou metal com tampa; 1 jarra por amostra.
4. Jarra de anerbiose, BBL GasPak, ou jarras de anaerobiose Oxoid com envelope e catalizador GasPak gerador de H₂ +CO₂.

5. Estufa, 35°C
6. Placa de Petri estéreis, 15 x 100mm
7. Alça de platina, 3 mm id
8. Banho maria, 46 ± 0,5°C
9. Kit Reversed passive latex agglutination (RPLA) para enterotoxina de *C. perfringens* (Oxoid USA)

Meio e reagentes

1. Agar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC)
2. Emulsão de gema de ovo, 50%
3. Caldo de fígado
4. Meio tioglicolato
5. Meio leite ferro
6. Meio lactose-gelatina
7. Meio esporulante, para *C. perfringens*
8. Meio nitrato-motilidade, tamponado
9. Meio de fermentação de Sray
10. Meio de esporulação AE
11. Meio de esporulação Duncan-Strong
12. Água peptonada
13. Reagente de detecção de nitrato
14. Solução sal-glicerina
15. Reagentes de coloração de Gram
16. Papeis para teste de fermentação. Filtro de papel Whatman No. 31 de 15 cm saturado com solução aquosa à 0,2% de azul de bromotimol com pH de 8 a 8,5.
17. Azul de bromotimol, 0,4%

Procedimentos para cultura e isolamento

Contagem em placa de *C. perfringens* viáveis

Prepare a coloração de Gram, buscando bastonetes Gram-positivos.

Usando técnicas de assepsia, posicione 25g de amostra na jarra do blender estéril. Adicione 225ml de diluente peptonado (diluição 1:10). Homogeneíze por 1-2 min em velocidade baixa. A partir dessa mistura, realize diluição seriadas 1:10, obtendo as concentrações 10^{-1} a 10^{-6} . Despeje 6-7 ml de ágar TSC sem gema de ovo em uma placa de Petri de 100 x 15 mm e espalhe vigorosamente. Quando o ágar solidificar, transfira assepticamente 1 ml de cada diluição homogeneizada no centro das placas. Despeje mais 15ml de ágar TSC sobre o inóculo e homogeneíze vigorosamente. Devem ser usadas placas em duplicata.

Prepare o caldo de fígado para inoculação, aquecendo-o por 10 minutos em água fervente e resfriando rapidamente sem agitar. Inocule 3 ou 4 tubos com 2 ml da solução 10^{-1} . Incubar esses tubos a 24-48 horas à 35°C . Ignore caso as placas para contagem de *C. perfringens* viáveis por positiva.

Teste de confirmação presuntivo

Selecione 10 colônias típicas (coloração negra com halo opaco) de *C. perfringens* do ágar TSC e inocule cada uma em um tubo de caldo tioglicolato fresco. Incube a 35°C a 18-24 horas. Examine cada cultura pelo método de Gram e observe se há pureza de bacilos Gram-positivos. Caso haja contaminações, plaqueie as colônias em ágar em meio TSC suplementado com gema de ovo e encube em câmara de anaerobiose à 35°C por 24h. Colônias superficiais de *C. perfringens* são amarelo-acinzentadas com zonas opacas de 2-4 mm causada pela atividade da lecitinase. Esse procedimento também é utilizado para isolar *C. perfringens* a partir do caldo fígado quando o organismo não é encontrado durante o plaqueamento no ágar TSC.

Teste presuntivo leite-ferro

Inocule o meio leite-ferro com caldo tioglicolato com as bactérias em crescimento e encube no banho maria a 46°C . Após 2h verifique a quanto a presença de fermentação com formação rápida de gás e coagulação de nata em uma massa esponjosa acima da superfície do meio (“*stormy fermentation*”). Remova os tubos positivos do banho maria para evitar o derramamento do seu conteúdo na água. Não utilize tubos curtos para essa reação. Culturas que não demonstrarem *stormy*

fermentation em 5 horas dificilmente apresentam *C. perfringens*. Algumas linhagens de *C. baratii* podem apresentar esse tipo de reação, mas elas podem ser diferenciadas pela sua incapacidade de liquefazer gelatina no meio lactose- gelatina. Esse teste presuntivo pode ser suficiente para algumas finalidades, porém, o teste completo sempre deve ser utilizado quando se trata de alimentos associados a surtos de contaminação alimentar.

Teste completo

Inocule os meios nitrato-motilidade e lactose-gelatina através de um furo no centro do meio com a alça de 2mm com o caldo tioglicolato ou o isolado de colônia do agar TSC. Encube por 24h à 35°C. Examina o meio lactose-gelatina quanto a presença de gás e mudança de cor de amarelo para vermelho, que indica produção de ácido. Resfrie os tubos a 5°C por 1 hora e examine quanto liquefação da gelatina.

Inocule o meio de esporulação com 1 ml do caldo tioglicolato e encube por 24 horas a 35°C. Prepare uma coloração de Gram a partir da colônia crescido no meio de esporulação, observando microscopicamente a presença de bastonetes Gram-positivos e endósporos. Armazene as culturas esporuladas a 4°C caso testes futuros sejam necessários.

C.perfringens não possui motilidade. Examine os tubos de nitrato-motilidade quanto a tipo de crescimento ao redor no inoculo. Organismos não moveis crescem apenas ao redor do inoculo. Organismos moveis possuem crescimento difuso, se afastando do inoculo.

C.perfringens reduz nitratos a nitritos. Para testar quanto a redução de nitratos, adicione 0,5ml do reagente de ácido sulfanílico e 0,2ml do reagente de alfa-nistilamina (kit de detecção de nitratos) ao cultivo no meio nitrato-motilidade. A coloração violeta dentro de 5 minutos indica a presença de nitritos. Caso não ocorra mudança de cor, adicione alguns grãos de zinco metálico e aguarde alguns minutos. A não aparição da cor violeta após a adição de zinco indica que os nitratos foram completamente reduzidos. Já o aparecimento da cor violeta após a adição do zinco indica a incapacidade do organismo de reduzir nitratos.

Procedimentos de cultivo para esporulação e produção de enterotoxina

Se os isolados forem testados imediatamente quanto a esporulação e enterotoxinas, realize o subcultivo em caldo tioglicolato como descrito acima. Culturas armazenadas devem ser subcultivadas em meio Difco e encubadas por 24 horas a 35°C, seguidos por 24 horas a temperatura ambiente. Misture o meio Difco em vortex, transfira 0,5ml para dois tubos contendo 10ml de caldo tioglicolato recém preparado. Aqueça um dos tubos em banho maria a 75°C por 10 minutos e em seguida encube a 35°C por 18 horas. Encube o segundo tubo a 35°C por 4 horas e inocule em meio de esporulação AE. Para melhores resultados, utilize 0,75ml do caldo tioglicolato em 15ml de meio de esporulação AE por 4 horas. Encube o meio inoculado por 18-24 horas a 35°C em jarra de anaerobiose.

Busque nas culturas esporos em microscopia de contraste de fase ou analisando esfregaço corado pelo método de Gram ou coloração para esporos (Wertz-Conklin). É considerado uma boa esporulação encontrar mais de 5 esporos por campo microscópico.

Centrifugue o meio de esporulação por 15 minutos a 10000g e analise o sobrenadante quanto a presença de enterotoxinas utilizando o kit RPLA.