

MARIA DE SÃO JOSÉ GARCIA ALEXANDRE NASCIMENTO DA FONSECA

**ESTUDO ULTRAESTRUTURAL E FISIOLÓGICO DE *C. DIFFICILE*
EFEITOS DA VANCOMICINA E DO METRONIDAZOL NA MORFOLOGIA,
ULTRAESTRUTURA E CRESCIMENTO**

**Porto
1995**

MARIA DE SÃO JOSÉ GARCIA ALEXANDRE NASCIMENTO DA FONSECA

Assistente da Faculdade de Farmácia

Universidade do Porto

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL E FISIOLÓGICO DE *C. DIFFICILE*
EFEITOS DA VANCOMICINA E DO METRONIDAZOL NA MORFOLOGIA,
ULTRAESTRUTURA E CRESCIMENTO

Porto

1995

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto.
(Art. 4º, D. L. 388/70)

Orientador: Professor Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa

Ao Pedro e à Patrícia

Ao José Luís

A meus Pais

Agradecimentos

Neste momento quero expressar a minha profunda gratidão ao Professor Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa, com quem iniciei a minha carreira docente e científica, a confiança que sempre em mim depositou, o apoio e o estímulo que sempre me deu durante todos estes anos, mesmo nesta hora particularmente difícil para ele.

Ao Professor Doutor Francisco Carvalho Guerra manifesto também a minha gratidão.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia de quem senti sempre apoio e encorajamento, um muito obrigado. Um agradecimento especial ao Miguel Cabral, pelo seu estímulo nos momentos de desânimo, à Nazaré T.S. Pestana e à Isaura Pinto de Sousa pelo grande apoio amigo.

Quero agradecer ainda:

-aos colegas do Laboratório de Bioquímica, em especial à Professora Doutora Natércia Teixeira, a valiosa ajuda na realização das electroforeses.

-ao colega Félix Carvalho o seu contributo na elaboração dos gráficos.

-ao Eng. Rui Pinto a ajuda no processamento do material fotográfico.

-aos técnicos e auxiliares do Laboratório de Microbiologia que me acompanharam ao longo destes anos.

-ao Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, na pessoa do Professor Doutor Manuel Teixeira da Silva, onde foi realizado todo o trabalho de microscopia electrónica. À Paula Macedo os ensinamentos relativos à microscopia electrónica.

Por último quero agradecer, ao meu marido e aos meus filhos, a quem privei de tantas horas de convívio, a compreensão que manifestaram em todos os momentos e o apoio que sempre me deram.

Ao abrigo do Decreto-Lei nº388/70, Art. 8º. parágrafo 2, alguns dos resultados apresentados nesta Dissertação constam das comunicações e publicações seguintes:

Nascimento, M. S. J., Sousa, J. C. F. & Aguiar, A. Estudo ultraestrutural de *Clostridium difficile*. 1º Congresso Mundial de Farmacêuticos de Expressão Portuguesa e 3º Congresso Nacional de Ciências Farmacêuticas. Lisboa. Maio, 1991.

Nascimento, M. S. J., Sousa, J. C. F. Efeito Pós-antibiótico da vancomicina em *Clostridium difficile*. Encontro de Jovens Investigadores em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Porto. Julho, 1992.

Nascimento, M. S. J., Sousa, J. C. F. & Aguiar, A. Efeito pós-antibiótico da vancomicina e metronidazol em *Clostridium difficile* ATCC 9689. 2º Congresso Nacional de Doenças Infecciosas. Póvoa do Varzim. Outubro, 1993.

Nascimento, M. S. J., Sousa, J. C. F. & Aguiar, A. 1993. Postantibiotic effect of vancomycin and metronidazole on *Clostridium difficile*. **Arquivos de Medicina**. 7(4): 207-210.

Participei na programação e realização dos estudos experimentais assim como na elaboração dos textos desses trabalhos.

Resumo

A primeira parte deste trabalho visou o estudo ultraestrutural e fisiológico de *C. difficile*. A caracterização ultraestrutural incidiu sobre células em fase exponencial, células em fase de declínio e células expostas ao oxigénio. Simultaneamente foi avaliada a influência das condições de fixação na ultraestrutura da forma vegetativa. Procedeu-se posteriormente ao estudo da camada superficial proteica (S-layer) da parede celular. A análise electroforética (SDS-PAGE) das suas duas proteínas revelou uma certa heterogeneidade nos pesos moleculares permitindo agrupar as diferentes estirpes em três grupos, contendo respectivamente proteínas com: (i) 48-50kDa e 34-35kDa, (ii) 41kDa e 34kDa, (iii) 47kDa e 41kDa. Não foi possível demonstrar nenhuma correlação entre o perfil electroforético das duas proteínas e a capacidade de produção de toxina A, exibindo estirpes toxígenas perfis idênticos a estirpes não toxígenas.

A capacidade de produção de protoplastos de *C. difficile* foi também avaliada tendo ficado demonstrado ser necessário, para uma obtenção eficaz, a presença de concentrações relativamente elevadas de lisozima e períodos de actuação longos. A presença de glicina na solução osmótica mostrou aumentar o número e a velocidade de formação de protoplastos enquanto que a adição de EDTA mostrou reduzir o número de protoplastos e provocar uma diminuição no seu tamanho.

A caracterização ultraestrutural estendeu-se também ao processo esporulativo o qual mostrou desenrolar-se segundo um processo idêntico ao de outras espécies do género *Clostridium* com a seguinte sequência de formação das estruturas do esporo: (i) parede esporal, túnica interna e exospório; (ii) cortéx; (iii) túnica externa. O esporo maduro apresentou certas características originais, tais como: (i) túnica interna de estrutura lamelar (5-8 lamelas); (ii) túnica externa espessa e electronodensa de aspecto crenado não estratificado; (iii) exospório em saco.

A segunda parte deste trabalho visou o estudo das alterações induzidas por concentrações sub-inibitórias (CIM/2) e supra-inibitórias (5x, 10x e 30x ou 40x CIM) de vancomicina e metronidazol na morfologia, ultraestrutura e crescimento de *C. difficile*. Ficou demonstrado que concentrações sub-inibitórias de vancomicina provocam um atraso significativo no crescimento de *C. difficile* ao mesmo tempo que induzem o aparecimento de formas filamentosas curtas, que a nível ultraestrutural mostram a presença de múltiplos septos parietais e espessamento das paredes. Concentrações sub-inibitórias de metronidazol parecem afectar apenas ligeiramente o crescimento de *C. difficile*, mas provocam também o aparecimento de longos filamentos ao mesmo tempo que induzem fenómenos de aderência entre as células. A exposição de *C. difficile* a concentrações supra-inibitórias de vancomicina e metronidazol mostrou levar igualmente ao aparecimento de grandes filamentos. Curiosamente o crescimento de *C. difficile*, quando monitorizado por contagem de células viáveis, mostrou-se mais rápido após exposição prévia a concentrações supra-inibitórias de vancomicina. Exposição idêntica ao metronidazol levou à supressão temporária do seu crescimento.

Este trabalho terminou com o estudo do efeito pós-antibiótico (PAE) da vancomicina e do metronidazol em *C. difficile*. Tendo sido avaliado pelo método de contagem de viáveis, este estudo revelou PAEs negativos para todas as concentrações de vancomicina estudadas (5x, 10x e 30x CIM) e para a concentração de metronidazol correspondente a 5xCIM. Estes PAEs negativos estiveram associados à presença de filamentos e ocorreram na ausência de uma acção bactericida significativa. Sómente a concentração de 40x CIM de metronidazol produziu um PAE significativo de 2.5h encontrando-se este associado a uma acção bactericida significativa. O aumento do tempo de exposição ao agente antimicrobiano de 1h para 2h não influenciou o PAE de nenhuma das drogas, mas o poder bactericida da vancomicina pareceu depender da duração desta exposição.

Résumé

La première partie de ce travail a visé l'étude ultrastructurel et physiologique de *C. difficile*. La caractérisation ultrastructurel a incidé sur des cellules en phase exponentielle, des cellules en phase de déclin et des cellules exposées au oxygen. On a avalié simultanément l'influence des conditions de fixation dans l'ultrastructure de la forme végétative. Postérieurement on a fait un étude sur la couche superficiel protéique (S-layer) de la paroi cellulaire. L'analyse électrophorétique (SDS-PAGE) de leur deux protéins a revelé une certaine hétérogénéité dans les poids moléculaires ce qui a permis grouper les différents souches en trois groupes, contenant respectivement des protéines avec: (i) 48-50kDa e 34-35kDa, (ii) 41kDa e 34kDa, (iii) 47kDa e 41kDa. On n'a pas pu demonstrier aucune corrélation entre le tracé électrophorétique des deux protéines et la capacité de production de la toxine A, exhibant les souches toxigènes des tracés identiques à des souches non toxigènes.

La capacité de production de protoplastes de *C. difficile* a été aussi avaliée. On a démontré la nécessité de la présence des concentrations élevés de lysozyme et des longues périodes d'incubation pour obtenir efficacement des protoplastes. La présence de la glycine dans la solution osmotique a augmenté le numéro et la vélocité de la formation de protoplastes tandis que l'addition d'EDTA a réduit ce numéro et a provoqué une diminution dans sa taille.

On a étendu la caractérisation ultrastructurel au processus de la sporulation lequel a montré dérouler selon un processus identique aux autres espèces du genre *Clostridium*, avec la suivante sequence de formation des structures de la spore: (i) paroi sporale, tunique interne et exosporium; (ii) cortex; (iii) tunique externe. La spore mûre a présenté des caractéristiques originaux: (i) tunique interne avec structure lamellaire (5-8 lamelles); (ii) tunique externe épaisse et electronodense, crénelée non stratifiée; (iii) exosporium en sac.

La deuxième partie de ce travail a visé l'étude des altérations induites par des concentrations sub-inhibitrices (CIM/2) et supra-inhibitrices (5x, 10x et 30x ou 40x CIM) de la

vancomycine et du métronidazole dans la morphologie, ultrastructure et croissance de *C. difficile*. On a démontré que des concentrations sub-inhibitrices de vancomycine provoquent un délai significatif dans la croissance de *C. difficile* ainsi que induisent la formation des formes filamenteux courtes, lesquelles montrent, au niveau ultrastructurel, la présence de multiples septum parietaux et epaissement des parois. Concentrations sub-inhibitrices de métronidazole affectent légèrement la croissance de *C. difficile*, mais provoquent aussi la formation des longues filaments, induisant aussi un phénomène d'adhésion entre les cellules. L'exposition de *C. difficile* aux concentrations supra-inhibitrices de vancomycine et métronidazole a montré également être capable de provoquer la formation des filaments. Curieusement, la croissance de *C. difficile*, monitorisée par comptage de cellules viables, se fait plus rapidement après une exposition préalable à des concentrations supra-inhibitrices de vancomycine. L'exposition au metronidazole provoque une supression temporaire de sa croissance.

Ce travail a terminé avec l'étude de l'effect pós-antibiotique (PAE) de la vancomycine et du métronidazole sur *C. difficile*. Evalué par la méthode des cellules viables, cet étude a revelé des PAEs negatif avec toutes les concentrations de vancomycine étudiés (5x, 10x et 30x CIM) et avec la concentration de métronidazole correspondant à 5xCIM. Toutes les PAEs negatif ont été associés à la présence de filaments et a l'absence d'une action bactéricide signifiante. Seulement la concentration de 40x CIM de metronidazole a produit un PAE significatif de 2.5h associé a une action bactéricide signifiante. L'augmentation du temps d'exposition a l' agent antimicrobienne de 1h jusqu'à 2h n'a pas influencé le PAE des deux drogues, mais le pouvoir bactéricide de la vancomycine a dependu de la durée de cette exposition.

Abstract

The ultrastructure and physiologie of *C. difficile* was studied in the first part of this work. The ultrastructural characterization was made on exponential and decline-phase cells and on oxygen exposed cells. The influence of the fixation conditions in the ultrastructure of the vegetative cell was evaluated simultaneously. A study of the surface layer (S-layer) of the cell wall was performed. The electrophoretic analysis of the two S-layer proteins have shown a heterogeneity in their molecular weight which allowed the division of the strains into three groups, containing, respectively, proteins with: (i) 48-50kDa e 34-35kDa, (ii) 41kDa e 34kDa, (iii) 47kDa e 41kDa. We could not found any correlation between the electrophoretic pattern of the two proteins and the capacity to produce toxin A. Toxigenic and non toxigenics strains have shown similar patterns.

The capacity of *C. difficile* to form protoplasts was studied. An efficient production of protoplasts required high lysosyme concentrations and long periods of incubation. The presence of glycine in the osmotic solution enhanced the number and the rate of formation of the protoplasts while the addition of EDTA induced a reduction of this number and on their size.

An ultrastructural characterization was also made in the course of the sporulation of *C. difficile*, which showed a similar development to other species of *Clostridium* genera with the following sequence of formation of the different spore structures: (i) spore wall, inner coat and exosporium; (ii) cortex; (iii) outer coat. The structure of the spore exhibited unique features: (i) an inner coat with a laminar structure, formed by 5-8 well defined layers; (ii) a thick, darker, non stratified outer coat; (iii) exosporium with a sack form.

In the second part of this work is reported the alterations induced by sub-inhibitory (MIC/2) and supra-inhibitory concentrations (5x, 10x, 30x or 40x MIC) of vancomycin and

metronidazole on morphology, ultrastructure and growth of *C. difficile*. It was shown that sub-inhibitory concentrations of vancomycin produced a delayed in the growth rate of *C. difficile* and at the same time, induced the formation of short filaments, which showed at ultrastructural level multiple cross walls and thickening of the cell walls. Sub-inhibitory concentrations of metronidazole affected slightly the growth rate of *C. difficile* but induced the formation of long filaments and simultaneously caused an adhesion phenomenon.

Exposition to supra-inhibitory concentrations of vancomycin and metronidazole also produce the formation of long filaments. Curiously, the growth of *C. difficile*, monitored by viable counting, showed an accelerated rate after a brief exposure to supra-inhibitory concentrations of vancomycin. Similar exposition to metronidazole induced a temporary suppression of bacterial growth.

The final study of this work aimed to evaluate the postantibiotic effect (PAE), determined by viable counting, of vancomycin and metronidazole on *C. difficile*. Negative PAEs were obtained with vancomycin in all the concentrations tested (5x, 10x and 30x MIC) and with metronidazole at 5xMIC. This negative PAEs were associated with the production of filaments, and occurred in the absence of significant bactericidal action. Positive PAEs, of up to 2.5h, were only seen with high concentrations of metronidazole, which were also strongly bactericidal. The PAEs of either drug was not influenced by extending the period of exposure to the antimicrobial agent from 1h to 2h although the bactericidal effect of vancomycin did appear to depend on the duration of exposure.

Índice

Introdução e objectivos.....	1
Material e Métodos.....	11
1. Estirpes bacterianas.....	12
2. Meios de cultura utilizados.....	13
2.1. <i>Clostridium difficile</i> Agar Base.....	13
2.2. Gelose Columbia.....	13
2.3. Caldo de Trypticase-soja.....	13
2.4. Gelose e caldo Schaedler.....	14
2.5. Meios de esporulação.....	14
3. Agentes antimicrobianos utilizados.....	15
4. Condições experimentais.....	15
5. Avaliação do crescimento bacteriano em meios líquidos não renovados.....	15
6. Estudo da morfologia e ultraestrutura bacteriana	16
6.1. Microscopia óptica.....	16
6.2. Microscopia electrónica de transmissão.....	16
6.2.1. Técnica dos cortes ultrafinos.....	16
6.2.2. Técnica de coloração negativa ("Negative Staining").....	18
6.2.3. Visualização de polissacáridos.....	18
6.2.4. Medição da espessura das paredes e flagelos.....	19
7. Métodos de obtenção de protoplastos.....	19
8. Estudo da S-layer.....	20
8.1. Isolamento da parede celular.....	20
8.2. Extracção de proteínas da S-layer.....	21
8.2.1. Doseamento de proteínas.....	21
8.2.2. Electroforese de proteínas em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).....	21
8.3. Observação da S-layer por microscopia electrónica, técnica dos cortes ultrafinos.....	22
9. Estudo cinético da esporulação em diferentes condições fisiológicas.....	22
9.1. Determinação do número de esporos.....	23
9.2. Preparação da suspensão de esporos livres.....	23

9.3. Tratamento dos esporos livres com ureia-mercaptoetanol.....	23
10. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da vancomicina e do metronidazol pelo E-teste.....	24
11. Determinação do Efeito Pós-Antibiótico (PAE) da vancomicina e do metronidazol.....	24
11.1. Estudo morfológico e ultraestrutural das bactérias em fase de PAE.....	26
12. Detecção da toxina A.....	26
13. Análise estatística de resultados.....	27
Resultados.....	28
Parte I- Estudo ultraestrutural e fisiológico de <i>C. difficile</i>.....	29
1. Caracterização ultraestrutural de células em fase exponencial.....	30
1.1. Parede celular.....	30
1.2. Membrana citoplasmática.....	30
1.2.1. Detecção ultraestrutural de componentes PAS-positivo.....	32
1.3. Citoplasma e nucleóide.....	32
1.4. Flagelos.....	35
2. Influência das condições de fixação na ultraestrutura das formas vegetativas.....	35
2.1. Células provenientes de meio líquido.....	35
2.2. Células provenientes de meio sólido.....	38
3. Caracterização ultraestrutural de células em fase de declínio.....	41
3.1. Provenientes de meio líquido.....	41
3.2. Provenientes de meio sólido.....	43
4. Caracterização ultraestrutural de células expostas ao oxigénio.....	43
5. Caracterização e isolamento da S-layer.....	47
5.1. Estudo da S-layer por microscopia electrónica.....	47
5.1.1. Observação de cortes ultrafinos de paredes celulares isoladas.....	47
5.2. Análise electroforética das proteínas da S-layer.....	47
6. Produção e caracterização de protoplastos.....	50
6.1. Importância da glicina.....	50
6.2. Influência do EDTA.....	52
6.3. Influência da S-layer.....	53
6.4. Influência dos tampões de incubação na acção da lisozima.....	53
7. Estudo da cinética de esporulação.....	54
7.1. Esporulação em meio de Wilson.....	54
7.2. Esporulação em meio de Duncan & Strong.....	55
7.3. Influência do meio de esporulação no processo esporulativo.....	56

8. Caracterização ultraestrutural do processo esporulativo.....	58
8.1. Fase I.....	58
8.2. Fase II.....	58
8.3. Fase III.....	60
8.4. Fase IV.....	60
8.5. Fase V.....	63
8.6. Fase VI.....	63
8.7. FaseVII.....	63
8.8. Exospório.....	66
8.9. Ultraestrutura de esporos livres tratados pela ureia-mercaptoetanol.....	66
Parte II- Vancomicina e metronidazol: efeito na morfologia, ultraestrutura e crescimento de <i>C. difficile</i>.....	69
1. Alterações morfológicas e fisiológicas induzidas por concentrações sub-inibitórias de vancomicina e metronidazol	70
1.1. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM).....	70
1.2. Efeito no crescimento bacteriano.....	72
1.2.1. Efeito da vancomicina	72
1.2.2. Efeito do metronidazol.....	74
1.3. Efeito na morfologia bacteriana (microscopia óptica).....	74
1.4. Efeito na ultraestrutura.....	77
1.4.1. Células crescendo em meio líquido.....	77
1.4.2. Células crescendo em meio sólido.....	83
1.5. Efeito na produção de protoplastos.....	88
2. Alterações fisiológicas e morfológicas induzidas por concentrações supra-inibitórias de vancomicina e metronidazol	89
2.1. Efeito na viabilidade e crescimento bacteriano.....	89
2.1.1. Efeito da vancomicina.....	89
2.1.2. Efeito do metronidazol.....	91
2.2. Efeito na morfologia bacteriana.....	93
2.3. Efeito na ultraestrutura.....	93
2.4. Efeito pós-antibiótico (PAE) da vancomicina e do metronidazol.....	96
2.4.1. Efeito residual dos agentes antimicrobianos.....	96
2.4.2. Determinação do PAE	97
2.4.2.1. Na estirpe ATCC 9689.....	97
2.4.2.2. Em várias estirpes clínicas.....	98

Discussão	100
Estudo ultraestrutural e fisiológico de <i>C. difficile</i>	101
Parede celular e "S-layer" de <i>C. difficile</i>	101
Membrana citoplasmática de <i>C. difficile</i>	105
Influência das condições de fixação na ultraestrutura de <i>C. difficile</i>	108
Ultraestrutura de células de <i>C. difficile</i> em fase de declínio e expostas ao ar.....	114
Protoplastos de <i>C. difficile</i>	115
Esporulação de <i>C. difficile</i>	119
Vancomicina e metronidazol: efeito de concentrações sub e supra-inibitórias na morfologia, ultraestrutura e crescimento de <i>C. difficile</i>	127
Conclusões gerais	137
Bibliografia	142
Anexo	158

Introdução e Objectivos

Clostridium difficile, agente etiológico da colite pseudomembranosa pós-antibiótica e principal responsável pelas diarreias associadas à antibioterapia prolongada (Bartlett *et al.*, 1978; Bartlett, 1990; George *et al.*, 1978; Larson *et al.*, 1978) é também reconhecido como agente comum da diarreia nosocomial (Johnson *et al.*, 1990; McFarland *et al.*, 1989).

C. difficile é um bacilo Gram positivo, anaeróbio estrito, esporogénico, com sobrevivência assegurada em ambiente aeróbio devido aos seus esporos aerotolerantes (Buggy *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 1981; Kamiya *et al.*, 1989).

C. difficile deve o seu efeito patogénico à produção de duas exotoxinas proteicas, a toxina A e a toxina B (Lyerly *et al.*, 1982; Lyerly *et al.*, 1988). Embora ambas sejam indutoras de efeito citopatogénico, detectável em vários tipos de células (Ahlgren *et al.*, 1983; Fiorentini *et al.*, 1990; Fiorentini *et al.*, 1993; Kushnaryov & Sedmak, 1989; Siffert *et al.*, 1993; Tucker *et al.*, 1990), a toxina B é consideravelmente mais citotóxica para a maior parte das culturas celulares (Eichel-Streiber *et al.*, 1987; Rotham *et al.*, 1984; Sullivan *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1981), sendo por isso denominada citotoxina. A toxina A, responsável pela acumulação do fluido entérico e pela destruição da mucosa do cólon (Lima *et al.*, 1988; Lyerly *et al.*, 1982; Lyerly *et al.*, 1985), é descrita como enterotoxina; o seu efeito exerce-se, no entanto, sem afectar a actividade da adenilciclase (Banno *et al.*, 1984; Lyerly *et al.*, 1982), o que indica ser o seu mecanismo de acção distinto do das verdadeiras enterotoxinas bacterianas, como a toxina colérica (Sharp & Hynie, 1971). O mecanismo da diarreia e da colite inflamatória desencadeada pelo *C. difficile* parece ser bastante complexo estando ainda por esclarecer. Embora se atribua à toxina A a maior parte das alterações intestinais (Lyerly *et al.*, 1985), é hoje aceite que as duas toxinas agem em sinergia e que ambas são indispensáveis à expressão do poder patogénico de *C. difficile* (Barbut *et al.*, 1992). A toxina A, cujo efeito biológico parece somente exercer-se após ligação ao receptor membranar presente nas células epiteliais intestinais (Krivan *et al.*, 1986; Pothoulakis *et al.*, 1993; Tucker & Wilkins, 1991), possui uma potente acção quimiotáctica de leucócitos polinucleares e células macrofágicas, as quais parecem estar na origem de resposta inflamatória intensa, geradora de destruição tecidual e necrose hemorrágica (Barbut *et al.*, 1992; Pothoulakis *et al.*, 1993). A toxina B,

sem efeito directo no epitélio intestinal intacto (Lima *et al.*, 1988; Lyerly *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1981), aproveitará o aumento da permeabilidade membranar para penetrar profundamente nas diferentes camadas tecidulares e exercer a sua forte acção citotóxica em sinergia com a toxina A (Barbut *et al.*, 1992). Esta lesão do epitélio intestinal favorecerá a disseminação sistémica das toxinas podendo explicar a presença de toxina B no sangue de doentes com colite pseudomembranosa severa (Qualman *et al.*, 1990).

As estirpes toxígenas caracterizam-se pela produção simultânea das toxinas A e B (Lyerly *et al.*, 1988). A elas se opõem as estirpes não toxígenas, que se mostram incapazes de produzir qualquer uma destas toxinas, devido à ausência dos genes que as codificam (Fluit *et al.*, 1991). Estes genes, localizados no cromossoma bacteriano, foram recentemente clonados e sequenciados (Barroso *et al.*, 1990; Dove *et al.*, 1990; Phelps *et al.*, 1991). Recentemente foi caracterizada uma estirpe produtora apenas de toxina B, a qual, apesar da ausência da toxina A, mostrou ter actividade enterotóxica (Borriello *et al.*, 1992.b.; Lyerly *et al.*, 1992). A descoberta desta estirpe abre novos horizontes sobre o papel desempenhado por estas toxinas na patogénese da doença por *C. difficile*.

Se bem que as toxinas A e B constituam os principais factores de patogenicidade de *C. difficile* outros potenciais factores de virulência têm sido descritos (Borriello, 1990). O seu envolvimento na patogénese da doença está, no entanto, ainda por elucidar.

Uma das características mais interessantes da infecção pelo *C. difficile* é a associação íntima entre tratamento antibiótico e diarreia (Bartlett, 1992; Bartlett, 1994). A maior parte dos doentes com complicações entéricas por *C. difficile* apresentam diarreia e revelam uma exposição prévia a um agente antimicrobiano, constituindo as excepções casos raros (Bartlett, 1992). Adultos submetidos a antibioterapia, vêem aumentada drasticamente não só a incidência de doença associada ao *C. difficile* como também a colonização intestinal assintomática por este organismo (Privitera *et al.*, 1991). A doença associada ao *C. difficile* pode surgir após antibioterapia oral ou parenteral e mostra-se independente da duração da ministração da droga (Bartlett, 1994). A ministração de antibióticos leva a importantes alterações na microflora intestinal normal, com desenvolvimento de ambiente favorável à

proliferação de *C. difficile* e à produção de toxinas (Barbut *et al.*, 1992). A natureza das alterações que predispõem ao crescimento de *C. difficile* são desconhecidas, sabendo-se apenas que o cólon é o local de eleição da colonização deste organismo (Bartlett, 1990). Casos de envolvimento do intestino delgado têm sido descritos, embora raramente (Tsutaoka *et al.*, 1994). Estudos em animais sugerem que a supressão de *C. difficile* pela microflora normal do cólon possa ser devida à competição por nutrientes (Wilson & Perini, 1988). Quase todas as drogas com actividade antibacteriana, incluindo alguns compostos antineoplásicos, como o fluoruracilo e o metotrexato, têm sido implicados como causa de diarreia/colite associada a *C. difficile* (Anand & Glatt, 1993; Bartlett, 1992; Cudmore *et al.*, 1982; Lyerly *et al.*, 1988), mas há umas que o são mais frequentemente, como a clindamicina, a ampicilina, e as cefalosporinas (Bartlett, 1981). Parecerá lógico que drogas com boa actividade contra *C. difficile* não causem doença e que drogas com grande impacto no componente anaeróbico da flora fecal estejam associadas a alta incidência de doença por *C. difficile*. A ampicilina e a vancomicina são drogas com grande actividade contra *C. difficile* mas, enquanto a ampicilina é um dos agentes ofensivos mais comuns, a vancomicina constitui o agente terapêutico de eleição (Bartlett, 1992). Por outro lado, o metronidazol, alternativa no tratamento de doença associada ao *C. difficile*, embora constituia uma das drogas mais potentes na erradicação de bactérias anaeróbias raramente causa doença, facto que presumivelmente reflecte o facto de ser completamente absorvida no intestino delgado atingindo concentrações praticamente nulas no cólon (Bartlett, 1992). Tais observações reflectem a existência de uma interacção complexa entre flora normal do cólon, *C. difficile* e a actividade antimicrobiana contra este agente e os componentes da flora responsável pelo controlo da população intestinal.

A doença associada a *C. difficile* é primariamente uma condição nosocomial, uma vez que, a quimioterapia antimicrobiana e antineoplásica, principais factores que predispõem o seu desenvolvimento, são comuns no doente hospitalizado. Os doentes mais afectados são por esse motivo, os imunossuprimidos, os idosos e os doentes submetidos a cirurgia, habitualmente sujeitos a tratamento antibiótico. A aquisição nosocomial de *C. difficile* tem

sido bem documentada (Clabots *et al.*, 1992; Heard *et al.*, 1986; Kato *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1990; McFarland *et al.*, 1989; Wust *et al.*, 1982). Cerca de 21% dos doentes admitidos no hospital tornam-se positivos para o *C. difficile* durante a hospitalização, dos quais apenas um terço desenvolve diarreia permanecendo a maioria portadores assintomáticos (McFarland *et al.*, 1989). Estes portadores saudáveis, potenciais reservatórios para a transmissão de *C. difficile* a outros doentes não apresentam maior risco para desenvolverem diarreia ou colite após exposição a tratamento antibiótico, constituindo este tratamento apenas um factor de risco para a colonização (Johnson *et al.*, 1990). A frequência de infecção pelo *C. difficile* parece aumentar progressivamente com o tempo de hospitalização (Clabots *et al.*, 1992), constituindo a idade avançada, assim como a severidade da doença subjacente, factores de risco de aquisição deste organismo (Hirschhorn *et al.*, 1994; McFarland *et al.*, 1990). *C. difficile* é isolado com frequência das mãos do pessoal de saúde e dos locais que rodeiam o doente com diarreia, constituindo ambos potenciais fontes de contaminação no meio hospitalar (Kim *et al.*, 1981; McFarland *et al.*, 1989; Mulligan *et al.*, 1980). Os esporos aerotolerantes de *C. difficile* desempenham papel fundamental ao persistirem nestes locais durante longos períodos e ao poderem ser transportados para outros locais do hospital (Buggy, 1983; Kim *et al.*, 1981; Mulligan *et al.*, 1980).

Com o objectivo de melhor se compreender a epidemiologia e a patogénese deste microorganismo, vários métodos de tipagem, capazes de distinguir as diferentes estirpes de *C. difficile*, têm sido desenvolvidos: padrões de susceptibilidade aos antibióticos, bacteriocinas e bacteriófagos, serotipagem por aglutinação, electroforese das proteínas totais em gel de poliacrilamida, toxigenicidade, análise de plasmídios, "imunoblotting", análise indirecta do genoma total com endonucleases de restrição, análise indirecta do genoma após hibridização com sonda, técnicas de PCR (Delmée *et al.*, 1985; Delmée *et al.*, 1986; Devlin *et al.*, 1987; Dzink *et al.*, 1980; Kato *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1993; Kato, 1994; Killgore & Kato, 1994; Mahony *et al.*, 1991, Sell *et al.*, 1983; Silva *et al.*, 1994; Steinberg *et al.*, 1987; Tabaqchali, 1990; Tabaqchali *et al.*, 1984; Wolfhagen *et al.*, 1993; Wust *et al.*, 1982). Todos estes métodos têm evidenciado a grande heterogeneidade das estirpes de *C. difficile*. A

aplicação da tipagem ao estudo da infecção nosocomial permitiu demonstrar a importância da infecção cruzada entre doentes e pessoal de saúde e confirmar a importância da contaminação ambiental (Clabots *et al.*, 1992; Heard *et al.*, 1986; McFarland *et al.*, 1989; Tabaqchali *et al.*, 1984; Wust *et al.*, 1982).

A infecção pelo *C. difficile* está associada a amplo espectro de situações clínicas que vão desde o estado de portador assintomático até à diarreia, passando pela situação clínica mais severa, a colite pseudomembranosa (Bartlett, 1990; Pothoulakis *et al.*, 1993). A situação mais comum é a diarreia, mas a frequência de portadores assintomáticos é mais elevada do que inicialmente se pensou. No adulto estima-se em 2-4% o número de portadores assintomáticos (Heard *et al.*, 1986; Stark *et al.*, 1982; Viscidi *et al.*, 1981), elevando-se esta taxa para 20-35% em indivíduos sujeitos a tratamento antibiótico ou hospitalizados (McFarland *et al.*, 1989; Viscidi *et al.*, 1981). Na criança recém-nascida, *C. difficile* coloniza o tracto intestinal de modo assintomático (Bolton *et al.*, 1984; Knoop *et al.*, 1993, Lyerly *et al.*, 1988). Mesmo quando a colonização é feita com estirpes toxígenas a criança não desenvolve, na maioria das vezes, nenhum sinal clínico (Larson *et al.*, 1982, Viscidi *et al.*, 1981), sendo os casos de colite pseudomembranosa só excepcionalmente descritos neste grupo etário (Mandal *et al.*, 1982; Scopes *et al.*, 1980). A frequência de isolamento no recém-nascido saudável situa-se nos 30-50% (Cooperstock *et al.*, 1983; Larson *et al.*, 1982; Miyazaki *et al.*, 1992), embora valores de 16% (Bacon *et al.*, 1988) e 90% (Stark *et al.*, 1982) tenham sido também já citados. A frequência de colonização do recém-nascido está relacionada com o tempo de hospitalização e com o padrão epidémico do ambiente hospitalar (Al-Jumaili *et al.*, 1984; Bacon *et al.*, 1988; Miyazaki *et al.*, 1992), estando as altas taxas de colonização neonatais associadas a longos períodos de hospitalização (Bacon *et al.*, 1988) e a uma circulação hiper-endémica de *C. difficile* (Sheretz & Sarubi, 1982). A criança parece adquirir o *C. difficile* por transmissão nosocomial, directamente a partir do meio que a rodeia ou através das mãos contaminadas do pessoal hospitalar ou de outras crianças (Al-Jumaili *et al.*, 1984; Bacon *et al.*, 1988; Bolton *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1981; Larson *et al.*, 1982). A colonização do recém-nascido pelo *C. difficile* não parece ser influenciada pelo tratamento

antibiótico mas sómente pelo tempo de internamento hospitalar (Miyazaki *et al.*, 1992). As elevadas taxas de colonização do recém-nascido são normalmente mantidas durante vários meses, mas por volta dos 6-12 meses, altura que corresponde ao estabelecimento da "flora adulta normal", as taxas de prevalência baixam para valores semelhantes ao do adulto saudável (Bartlett, 1990; Stark *et al.*, 1982; Viscidi *et al.*, 1981). A resistência das crianças à doença por *C. difficile*, mesmo quando estão presentes nas suas fezes concentrações elevadas de *C. difficile* e de toxinas A e B, está bem documentado (Al-Jumaili *et al.*, 1984; Bolton *et al.*, 1984; Donta & Meyers, 1982; Larson *et al.*, 1982; Libby *et al.*, 1983; Stark *et al.*, 1982), mas ainda hoje se desconhecem as razões da ausência de progressão para a doença, podendo tal resistência resultar da combinação de numerosos factores (Lyerly *et al.*, 1988). Presença no colostro de substâncias neutralizantes das toxinas (Kim *et al.*, 1984; Wada *et al.*, 1980), menor sensibilidade às toxinas por parte das células intestinais fecais ou ausência de receptores para a toxina A (Lyerly *et al.*, 1988), são algumas das hipóteses apontadas.

Tem sido sugerido que o espectro e a severidade da situação clínica observada na infecção por *C. difficile* possam resultar do facto das diferentes estirpes variarem na sua capacidade intrínseca para causar doença, parecendo existir uma relação entre o tipo de isolado, a manifestação clínica e a produção de toxinas pelo *C. difficile* (Delmée *et al.*, 1986; Delmée & Avesani, 1990; McFarland *et al.*, 1989; Tabaqchali *et al.*, 1984; Toma *et al.*, 1988). Estirpes pertencentes a serogrupos toxígenos são isolados com mais frequência de adultos com colite pseudomembranosa ou diarreia, enquanto que estirpes pertencentes a serogrupos não toxígenos são encontradas frequentemente em recém-nascidos e na criança jovem assintomática (Delmée *et al.*, 1986; Toma *et al.*, 1988). Curiosamente os serogrupos toxígenos estão associados a padrões de grande resistência aos agentes antimicrobianos (Barbut *et al.*, 1993), sendo sugerido que tal determinante possa desempenhar um papel importante na virulência associada a *C. difficile* (Roberts *et al.*, 1994). Mas, certos serogrupos toxígenos são isolados invariavelmente de recém-nascidos assintomáticos e adultos sintomáticos (Delmée & Avesani, 1990; Toma *et al.*, 1988) e, em adultos hospitalizados, estirpes provenientes de portadores saudáveis podem estar associadas a

doença severa (McFarland *et al.*, 1989). A patogenicidade não parece ser simplesmente um fenómeno específico de estirpe, podendo factores dependentes do hospedeiro constituir determinantes importantes na expressão clínica da doença (McFarland *et al.*, 1991).

O diagnóstico exacto da doença intestinal causada por *C. difficile* continua a ser ainda um problema. O simples isolamento do microorganismo tem valor limitado no diagnóstico da doença dada a existência de estirpes não toxígenas, destituídas de qualquer poder patogénico, que tornam difícil a interpretação de uma cultura positiva (Bartlett, 1990; Borriello & Honour, 1983; Lysterly *et al.*, 1988). Torna-se necessário provar a capacidade de produção de toxina para se considerar a estirpe potencialmente patogénica. O ensaio de citotoxicidade em culturas celulares, o qual detecta primariamente a toxina B, constitui o método de referência (Bartlett, 1992). Mas devido à importância da toxina A na patofisiologia desta doença e à existência de estirpes toxina A+/toxina B-, têm sido feitas tentativas para o desenvolvimento de testes para a detecção específica desta toxina (Borriello *et al.*, 1992.a.; DiPersio *et al.*, 1991; Whittier *et al.*, 1993). A recente aplicação de uma sonda específica da toxina A à detecção de estirpes toxígenas poderá vir a constituir uma excelente alternativa aos ensaios de citotoxicidade (Kato *et al.*, 1991; Wren *et al.*, 1990). A existência de indivíduos, com quadro clínico compatível com doença associada a *C. difficile*, sem citotoxina nas fezes mas com cultura positiva para *C. difficile*, que se mostra toxígena *in vitro* (Clabots *et al.*, 1992) aponta para a necessidade do diagnóstico assentar não só na demonstração da presença de toxina nas fezes mas também no isolamento do microorganismo com a subsequente demonstração da sua capacidade em produzir toxina (Lysterly *et al.*, 1988). Por outro lado o facto de *C. difficile* e as suas toxinas estarem frequentemente presentes em indivíduos assintomáticos (Viscidi *et al.*, 1981), mostra que a capacidade de produção de toxinas não é por si só suficiente para diagnosticar a doença induzida por *C. difficile* tornando-se necessário, para o diagnóstico definitivo, a conjugação dos dados clínicos com os resultados laboratoriais.

Uma vez que a doença por *C. difficile* é uma condição induzida pelo uso de antibióticos será desejável um regime de prevenção ou de tratamento que evite o seu uso. Várias modalidades, que não a administração de antibióticos, têm sido usadas com algum sucesso (George *et al.*,

1980; Schwan *et al.*, 1984; Gorbach *et al.*, 1987). Salienta-se a utilização de *Saccharomyces boulardii*, levedura termofílica, não patogénica, que mostrou reduzir a incidência da diarreia associada aos antibióticos nos doentes hospitalizados (Surawicz *et al.*, 1989.a) e que parece ter papel importante, quando ministrada conjuntamente com vancomicina, no tratamento da colite recorrente por *C. difficile* (Surawicz *et al.*, 1989.b). Os estudos realizados com esta levedura em modelos animais têm-se mostrado muito promissores (Corthier *et al.*, 1986; Elmer & McFarland, 1987; Toothaker & Elmer, 1984). A maior parte dos casos de diarreia por *C. difficile* resolvem-se com a interrupção do antibiótico agressor, mas os casos mais severos necessitam de tratamento antimicrobiano. A ministração oral de vancomicina constitui o tratamento de eleição e o metronidazol a principal alternativa terapêutica (Bartlett, 1992; Teasley *et al.*, 1983). Bacitracina, teicoplanina e ácido fusídico são agentes antimicrobianos eficazes quando administrados oralmente (DeLalla *et al.*, 1992; Bartlett, 1990). Apesar do importante papel desempenhado pela vancomicina e pelo metronidazol no tratamento da doença associada ao *C. difficile*, têm sido detectadas, após descontinuidade do tratamento, recaídas em mais de 20% dos doentes (Bartlett, 1994; Teasley *et al.*, 1983), frequência não afectada pelo antibiótico em causa, pela dose ou pela duração do tratamento (Bartlett, 1994). Estas recidivas podem ser explicadas quer pela sobrevivência de *C. difficile* sob a forma de esporo, insensível aos antibióticos, que sobrevive e reverte posteriormente à forma vegetativa, quer pela reinfecção por uma nova estirpe exógena (Kim *et al.*, 1981; Johnson *et al.*, 1989). Este comportamento ambíguo complica a terapêutica e aponta para a necessidade de melhor compreensão do modo de acção destes agentes antimicrobianos sobre esta bactéria.

* * *

Foi objectivo principal do nosso trabalho a avaliação do efeito da vancomicina e do metronidazol na morfologia, ultraestrutura e crescimento de *C. difficile*. Para tal foram estudadas as alterações provocadas quer por concentrações sub-inibitórias quer por

concentrações supra-inibitórias e avaliada não só a velocidade e a extensão do efeito bactericida destas duas drogas como também a duração do seu efeito pós-antibiótico, factores que, pelo menos teóricamente, afectam a eficácia terapêutica de um agente antimicrobiano (Hessen *et al.*, 1989).

Tornou-se, no entanto, necessário realizar previamente o estudo da ultraestrutura deste microorganismo assim como conhecer alguns dos aspectos da sua fisiologia, a fim de estabelecer o padrão de normalidade ultraestrutural e fisiológico, fundamental para a interpretação das alterações observadas na bactéria sujeita à acção destes dois agentes antimicrobianos.

Material e Métodos

1. Estirpes bacterianas

Neste estudo foram utilizadas as seguintes estirpes de *C. difficile* :

ATCC 9689, estirpe toxígena, obtida da American Type Culture Collection
(Maryland, USA)

CD1, CD2, CD11, CD22, CD24, CD26, CD34, CD41, CD50, CD55, CD56,
CD60, CD74, CD89, CD101, CD145, CD146, CD147, CD148

Todas as estirpes CD foram isoladas de fezes de crianças, com idades compreendidas entre os 5 dias e os 3 anos (idade média 16 meses), provenientes do Serviço de Pediatria do Hospital de S. João do Porto. A descrição detalhada da origem das estirpes encontra-se indicada em **Anexo** (Tabelas A, B, C, D).

O seu isolamento a partir das fezes foi realizado em meio selectivo *Clostridium difficile* Agar Base (descrito em 2.1.) tendo-se procedido previamente à selecção de esporos através do tratamento pelo álcool etílico 95% (Merck, Darmstadt, Germany). Assim, uma amostra de fezes foi misturada com igual quantidade de etanol absoluto e submetida a agitação durante 30 min à temperatura ambiente. Procedeu-se depois ao isolamento de uma alíquota da amostra tratada. Seguiu-se uma incubação de 24 h a 37°C em anaerobiose. A identificação das estirpes baseou-se no (i) aspecto característico das colónias (não hemolíticas, grandes, rasas, com bordos irregulares, cinzentas esbranquiçadas), (ii) na reacção ao Gram, (iii) na morfologia celular e (iv) no comportamento bioquímico, utilizando o microssistema API 20A (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Após o isolamento, todas as estirpes foram conservadas a -70°C em caldo Schaedler (descrito em 2.4.) com 15% de glicerol (Merck). A fim de testar a sua pureza e aerotolerância, antes de cada ensaio, as estirpes foram descongeladas e posteriormente subcultivadas em gelose Columbia (ver 2.2.), simultaneamente em anaerobiose e aerobiose. As estirpes só foram utilizadas quando o crescimento ocorreu apenas em anaerobiose.

2. Meios de cultura utilizados

2.1. *Clostridium difficile* Agar Base (Oxoid, Hampshire, England)

Proteose peptona	g/L	40.0
Na ₂ HPO ₄		5.0
KH ₂ PO ₄		1.0
MgSO ₄		0.1
NaCl		2.0
Frutose		6.0
Agar		15.0

pH 7.4

adicionado de 7% de sangue de cavalo desfibrinado (Laboratório Imunológico, Lisboa) e suplementado com os antibióticos D-cicloserina (500 mg/L) e cefoxitina (16 mg/L) (*Clostridium difficile* Supplement, Oxoid).

Este meio foi usado no isolamento de *C. difficile* a partir das fezes.

2.2. Gelose Columbia (bioMérieux)

bio-Polytone	g/L	10.0
Hidrolisado de proteínas animais e vegetais		10.0
bio-Myotone		3.0
Amido		1.0
NaCl		5.0
Agar		13.5

pH 7.3

suplementada com 5% sangue de carneiro desfibrinado.

Este meio foi usado na avaliação da pureza das estirpes

2.3. Caldo de Trypticase-soja (bioMérieux)

bio-Trypcase	g/L	17.0
bio-Soyase		3.0
NaCl		5.0
K ₂ HPO ₄		2.5
Glucose		2.5

pH 7.3

Este meio foi usado na obtenção das culturas utilizadas na detecção da toxina A.

2.4. Gelose e caldo Schaedler (bioMérieux)

Caldo Trypcase soja	g/L	10.0
bio-Polytone		5.0
Extracto levedura		5.0
Dextrose		5.0
L-Cistina		0.4
Hémina		0.01
Tris (hidoximetil) aminometano		3.0
Agar	com/sem	15.0
pH 7.6		

O meio Schaedler foi usado na conservação das estirpes, na determinação das concentrações mínimas inibitórias, no estudo do efeito pós-antibiótico, na obtenção de protoplastos e sempre que foi necessário avaliar o crescimento bacteriano

Adicionado de vancomicina ou metronidazol, foi usado no estudo das alterações induzidas pelas doses sub-inibitórias e supra-inibitórias destes dois agentes antimicrobianos no crescimento, morfologia e ultraestrutura de *C. difficile*.

2.5. Meios de esporulação

Para os estudos de esporulação foram usados o meio descrito por Wilson *et al.* (1982) constituído por:

Trypticase peptona (Difco, Michigan, USA)	g/L	90
Proteose peptona nº3 (Difco)		5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (MercK)		1.0
Tris(hidoximetil) aminometano (MercK)		1.5
pH 7.4		

e o meio descrito por Duncan & Strong (1968) constituído por:

Extracto de levedura (Difco)	g/L	4.0
Proteose peptona nº3(Difco)		15
Amido solúvel (Difco)		4
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (MercK)		10

Dado que as incubações ocorreram sistematicamente em câmara de anaerobiose, omitimos o tioglicolato de sódio (1g/L) da composição original do meio de cultura, o qual, noutras condições culturais, teria a função de criar um baixo potencial redox, compatível com o crescimento de bactérias anaeróbias.

3. Agentes antimicrobianos utilizados

Foram usados o cloridrato de vancomicina e o metronidazol (Sigma, Chemical Company, USA). Soluções aquosas de vancomicina (3.75 mg/10 ml) e metronidazol (0.95 mg/10 ml) foram esterilizadas por membrana filtrante com a porosidade média de 0.2 µm (Gelman Sciences, USA). As soluções foram mantidas a -70°C até à sua utilização.

4. Condições experimentais

Todas as manipulações e incubações foram realizadas em câmara de anaerobiose (Compact-DW Scientific, West Yorkshire, UK) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂. Só em casos pontuais se recorreu ao sistema de anaerobiose em jarro (Generbox, bioMérieux).

Todos os meios de cultura, utilizados nos ensaios, sofreram uma redução prévia, em câmara de anaerobiose, antes da sua utilização. Para os meios sólidos, recentemente preparados, foi estabelecido um tempo mínimo de pré-redução de 1 h e para os meios líquidos de 18 h.

5. Avaliação do crescimento bacteriano em meios líquidos não renovados

O crescimento bacteriano foi avaliado por turbidimetria (A₅₄₀) com espectrofotómetro (Baush & Lomb 20) e por contagem de células viáveis (c.f.u./ml) pelo método das diluições. Todas as culturas foram realizadas em caldo Schaedler e incubadas a 37°C, sem agitação, em anaerobiose.

As culturas iniciaram-se pela inoculação de uma cultura com 16-18 h na proporção de 10⁻² (v/v), tendo sido retiradas amostras de hora a hora. Os valores de absorvância foram

registados e a contagem de células viáveis foi determinada pela diluição seriada das amostras (10^{-1}) em NaCl (Merck) 0.9% e posterior inoculação de 0.1 ml, de cada diluição, em placas de Petri contendo gelose de Schaedler. A contagem das colónias (c.f.u./ml) foi feita após 18-24 h de incubação a 37°C, em anaerobiose.

Foi avaliado de igual modo o crescimento bacteriano na presença de concentrações sub-inibitórias (CIM/2) de vancomicina ou metronidazol.

6. Estudo da morfologia e ultraestrutura bacteriana

6.1. Microscopia óptica

A morfologia bacteriana foi estudada por microscopia óptica, após coloração das bactérias pelo método de Gram, com uma ampliação de 400 x e 1000 x.

6.2. Microscopia electrónica de transmissão

6.2.1. Técnica dos cortes ultrafinos

A ultraestrutura bacteriana foi estudada por microscopia electrónica, segundo a técnica dos cortes ultrafinos, descrita por Silva (1984).

As bactérias foram fixadas pelos processos seguintes:

Fixação GAFACA/OsO₄ - Fixação com GAFACA: formaldeído (Merck) a 4% (p/v) em tampão de cacodilato (TAAB, Aldermast, England) 0.1M, pH 7.0 contendo 1.25% (p/v) de glutaraldeído (Merck) e 10 mM de CaCl₂ (Merck) durante 24 h a 4°C; em seguida as células foram centrifugadas a 2 500g (centrífuga Sigma 3K-2) durante 10 min a 4°C e submetidas a duas lavagens com tampão cacodilato; posteriormente foram pós-fixadas com OsO₄ (Sigma) 1% (p/v), contendo 10 mM de CaCl₂, durante mais de 24 h e com acetato de uranilo (TAAB) 0.5% em solução aquosa (p/v) durante 30 min.

Fixação OsO₄/GAFACA - Fixação com OsO₄ 1%, contendo 10 mM de CaCl₂ durante 24h. Em seguida as células foram centrifugadas, submetidas a duas lavagens com tampão cacodilato e pós-fixadas com GAFACA durante mais 24 h a 4°C, seguindo-se o tratamento com acetato de uranilo 0.5% em solução aquosa (p/v) durante 30 min.

Tentou-se sempre que possível, dado tratar-se de uma bactéria anaeróbia estrita, que o início da fixação fosse realizado em condições de total anaerobiose.

No caso de bactérias crescendo à superfície de meios sólidos o fixador foi adicionado directamente às colónias e deixado actuar durante 10 min. As colónias foram depois removidas e a cultura, retirada da câmara de anaerobiose, foi centrifugada (2 500g /10 min) tendo as células sido ressuspensas no mesmo fixador por mais 24 h.

No caso das culturas líquidas 1 vol do fixador foi adicionado a 4 vol de cultura e deixado actuar durante um período de 10 min, findo o qual a cultura foi retirada da câmara de anaerobiose. As bactérias recolhidas então por centrifugação (2 500g /10 min) foram ressuspensas no mesmo fixador e a fixação continuou por mais 24 h. A este processo nos referiremos como pré-fixação ou fixação em caldo em condições de anaerobiose. A este se opôs o processo sem pré-fixação em caldo, no qual o fixador foi adicionado às bactérias só após a sua recolha por centrifugação, portanto já em condições de aerobiose.

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol em solução aquosa (70%, 90%, 10 min cada, 100%, 4 vezes, 10 min cada) sendo depois mergulhadas sequencialmente em óxido de propileno (Merck) durante 10 min, óxido de propileno/Epon (1/1) durante 30 min e Epon durante 16-18 h. Foi usada a mistura B de Epon descrita por Luft (1961) constituída por partes iguais de Epon 812 (TAAB) e MNA (TAAB) e 2,4 % de DMP₃₀ (TAAB). As amostras foram transferidas para cápsulas de gelatina e cheias com nova resina Epon. Seguiu-se a polimerização a 60°C durante 2 dias. Os cortes ultrafinos, obtidos com faca de diamante em micrótomo LKB Ultratome III, foram

recolhidos em grelhas de cobre (400 mesh) revestidas com 1% parlódio (TAAB) e contrastadas com uma solução aquosa saturada de acetato de uranilo (TAAB) durante 60 s seguida de citrato de chumbo (TAAB) 5 min.

Todas as observações foram realizadas em microscópio electrónico Siemens Elmiskop IA ou Zeiss EM 10 C e registadas em películas fotográficas Agfa-Gevaert.

6.2.2. Técnica de coloração negativa ("Negative Staining")

As bactérias recolhidas por centrifugação (2 500g /10 min) foram ressuspensas em PBS, pH 7.2 (bioMérieux). Uma gota da suspensão foi colocada em grelha de cobre (400 mesh) revestida com parlódio. Após 3 min o excesso foi removido com papel de filtro e a grelha lavada três vezes com PBS. Seguiu-se a coloração negativa com ácido fosfotúngstico (Merck) 1% (p/v) em água, pH 7.0 durante 1 min. O excesso foi removido com papel de filtro. Procedeu-se à observação no microscópio electrónico.

6.2.3. Visualização de polissacáridos

Foi usada a técnica de Thiéry (Thiéry, 1967; Thiéry & Rambourg, 1974). Cortes ultrafinos foram montados em grelhas de ouro e pré-tratados com H₂O₂ (Merck) a 3%, durante 10-15 min, de modo a assegurar uma completa remoção do ósmio ligado. Após lavagem com água procedeu-se ao tratamento com ácido periódico (Merck) 1% em solução aquosa, durante 30 min, seguindo-se uma exposição de 2-48 h à tiosemicarbazida (Merck) 10% em ácido acético (Merck). As grelhas foram depois lavadas com ácido acético a 10%, ácido acético a 5% e água, durante períodos de 15-30 min cada lavagem. Seguiu-se a coloração com a solução aquosa de proteinato de prata (Merck) 1% durante 30 min, no escuro, e finalmente uma lavagem com água durante 30-60 min. Seguiu-se a observação por microscopia electrónica.

6.2.4. Medição da espessura das paredes e flagelos

A medição da espessura das paredes e dos flagelos foi efectuada em positivos fotográficos ampliados. As medidas foram repetidas pelo menos duas vezes em momentos diferentes, num mínimo de trinta determinações.

7. Métodos de obtenção de protoplastos

Células da fase exponencial de crescimento, provenientes de caldo Schaedler com ou sem glicina (Merck) 0.4% (p/v) foram adicionadas, na proporção de 1 vol para 4 vol, a várias soluções cujo gradiente osmótico estabilizador foi conferido pela presença de 0.5 M de sacarose (Merck):

(i) caldo Schaedler

(ii) caldo Schaedler + glicina 0.4%

(iii) caldo Schaedler + glicina 0.4% + EDTA (Merck) 10 mM

(iv) Tampão fosfato 0.05 M, pH 8.0 + glicina 0.4%

(v) Tampão Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0 + glicina 0.4%

Foi usada também a solução osmótica consituída por Schaedler e glicina 0.4% tendo desta vez o gradiente osmótico estabilizador sido conferido pela concentração 6 M de ureia (Merck).

A liozima (Sigma) foi por fim adicionada na concentração final de 1 mg/ml. Seguiu-se uma incubação a 37°C, sempre em condições de anaerobiose, tendo-se procedido à observação e contagem dos protoplastos nas cinco horas que se seguiram e às 24 h, em microscópio de contraste de fase (Nikon, Japan) usando uma ampliação de 400 x. Para a determinação da % de protoplastos foi contado um total de 300 células em 8 campos diferentes da lâmina.

Os protoplastos obtidos foram processados para microscopia electrónica (ver 6.2.1.). Dada a necessidade de fixar protoplastos directamente na solução osmótica, metodologia que impõe

uma diluição obrigatória do fixador, e uma vez que é conhecida a acção agressora de baixas concentrações de OsO₄ sobre estas estruturas (Silva *et al.*, 1976.b), procedeu-se à fixação dos protoplastos sómente pelo método GAFACA/OsO₄, já que estes são bem preservados quando a fixação é iniciada pelos aldeídos. Todas as amostras foram fixadas em condições de total anaerobiose.

Para a obtenção de protoplastos foram também usadas células em fase de crescimento logarítmico, em caldo Schaedler sem glicina, contendo doses sub-inibitórias (CIM/2) de vancomicina e metronidazol.

8. Estudo da S-layer

8.1. Isolamento da parede celular

Foi usada uma adaptação à técnica descrita por Kawata *et al.* (1984). Uma cultura (500 ml) em caldo Schaedler no início da fase de crescimento logarítmico foi submetida a uma centrifugação de 2 000g (centrífuga Runne Heidelberg, Modell RSV-20) durante 15 min a 4°C. Procedeu-se a uma lavagem do sedimento celular com água destilada gelada e após ressuspensão das células em água estas foram submetidas à acção de um desintegrador ultrasónico (Labsonic 2000) operando a 70 watts num tempo total de 2 min e 30 s, durante o qual foram constantemente arrefecidas em gelo. Seguiu-se nova centrifugação a 800g (centrífuga Sigma 3k-2) durante 10 min a 4°C, afim de remover as células intactas. O sobrenadante foi depois centrifugado a 3 000g durante 10 min a 4°C. O sedimento foi lavado sequencialmente com NaCl (Merck) 1M e Triton X-100 (Sigma) a 2% afim de remover os fragmentos da membrana citoplasmática e finalmente lavado com água gelada e submetido a centrifugação. O sedimento final constituído por largos fragmentos de parede ainda contendo a camada proteica superficial, S-layer, foi denominado por "fracção de parede celular".

8.2. Extracção de proteínas da S-layer

Adaptação da técnica descrita por Kawata *et al.* (1984). A "fracção de parede celular" obtida em 8.1. foi submetida ao tratamento com ureia (Merck) 6M durante 1 h a 37°C. Seguiu-se uma centrifugação de 38 000g (ultracentrífuga Beckman L-80, rotor 80 Ti) durante 30 min a 15°C. O sobrenadante foi dialisado contra água a 4°C durante 18 h, tendo-se procedido à quantificação do seu conteúdo proteico e posteriormente à electroforese em gel de poliacrilamida.

8.2.1. Doseamento de proteínas

A concentração proteica foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). Para a elaboração da curva padrão foi usada a Albumina Bovina Fracção V (Sigma), a qual diluída em água a uma concentração de 1 mg/ml, apresentou uma absorvância de 0.67 a 280 nm. A partir desta solução foram realizadas diluições obtendo-se uma gama de concentrações de 0-100 µg/100 µl. Após adição de 5 ml do reagente de Bradford (0.01% Azul brilhante de Coomassie, Sigma, 14.7% etanol, 8.5% ácido fosfórico, Merck) a 100 µl das soluções padrão e problema foi construída uma curva padrão a partir dos resultados das absorvâncias obtidas a 595 nm em função da concentração da proteína. Esta curva foi depois usada para determinar a concentração de proteína para cada solução problema.

Todas as leituras foram efectuadas em espectrofotómetro Shimadzu UV-265 (Kyoto, Japan).

8.2.2. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise electroforética das proteínas em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), foi realizada segundo método de Laemmli modificado (1970), usando um gel vertical de concentração ("stacking gel") de 4% e um gel de resolução ("separating gel") de 9.5%, preparados a partir de uma solução de acrilamida (Sigma) a 30% (w/v) e bisacrilamida (Sigma) a 0.8% (w/v). Antes da aplicação no gel as amostras foram

diluídas na proporção de 1:1 (v/v) em tampão de solubilização de proteínas, numa concentração final de 0.06 M Tris, pH 6.8, 2% SDS (Merck), 10% glicerol (Merck), 5% 2-mercaptoetanol (Merck), 0.001% azul de bromofenol (Sigma) e em seguida fervidas a 100°C durante 5 min. Foi aplicada por amostra uma concentração de 13-15µg de proteína. O sistema foi submetido a uma corrente constante de 20 mA num tampão de corrida constituído por 0.025 M Tris, pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS. Após electroforese os geis foram corados pelo Azul de Coomassie (0.125% Azul de Coomassie R-250, 50% metanol, 10% ácido acético) e descorados com uma mistura de 50% metanol, 10% ácido acético. Como marcador de pesos moleculares foi utilizado o padrão SDS-7 B (Sigma) contendo a seguinte mistura de proteínas: isomerase triosefosfato (33.5KDa), desidrogenase láctica (38KDa), fumarase (56KDa), piruvato quinase (65KDa), frutose-6-fosfato quinase (88KDa), β -galactosidase (125 KDa), α_2 -macroglobulina (190 KDa).

8.3. Observação da S-layer por microscopia electrónica, técnica dos cortes ultrafinos

Cortes ultrafinos da "fracção de parede celular" obtida em 8.1. foram preparados e observados como descrito em 6.2.1.

9. Estudo cinético da esporulação em diferentes condições fisiológicas

A estirpe ATCC 9689 e a estirpe clínica CD1, obtidas de gelose de sangue, foram inoculadas em 10 ml dos meios de esporulação descritos em 2.5. e incubadas a 37°C durante 48 h. Um enriquecimento em formas esporulativas foi conseguido através de sucessivos choques térmicos tal como descrito por Ketley *et al.* (1986). Assim após 48 h de crescimento as culturas foram submetidas a choque térmico de 75°C durante 20 min (para eliminação das formas vegetativas) e rapidamente arrefecidas em gelo tendo em seguida 1ml destas culturas sido inoculado em 10 ml de novo meio de esporulação. Este ciclo foi repetido mais duas

vezes. A cultura final, enriquecida em formas esporulativas, foi finalmente inoculada em 100 ml de meio de esporulação, com uma concentração inicial de 2×10^7 células/ml e incubada anaeróticamente a 37°C. Amostras da cultura foram retiradas ao longo do processo de esporulação tendo-se procedido à contagem das células vegetativas e esporuladas (ver 9.1.) e posteriormente ao seu processamento para microscopia electrónica (ver 6.2.1.).

9.1. Determinação do número de esporos

A contagem das células, esporuladas e vegetativas, foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica em contraste de fase, com uma ampliação de 400x.

9.2. Preparação da suspensão de esporos livres

Para a produção de esporos livres foram usadas culturas enriquecidas em formas esporulativas (ver 9) tendo a cultura final sofrido uma incubação de 5 dias a 37°C. Os esporos recolhidos por centrifugação a 9 600g durante 15 min, a 4°C, foram lavados e ressuspensos num volume adequado de água destilada estéril de modo a obter-se uma concentração de $0.5-1.0 \times 10^7$ /ml. Esta suspensão aquecida depois a 70°C durante 10 min (afim de destruir as formas vegetativas) foi conservada a 4°C.

9.3. Tratamento dos esporos livres com ureia-mercaptoetanol

Os esporos livres preparados conforme indicado em 9.2. foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 0.1M contendo ureia (8M) e mercaptoetanol (1%), pH 8.5, durante 2 h, à temperatura de 37°C. O tratamento foi terminado com três lavagens com tampão cacodilato 0.01M, pH7, sendo os esporos sempre recolhidos por centrifugação a 9 600g durante 15 min, a 4°C. O sedimento final foi processado para microscopia electrónica como descrito em 6.2.1..

10. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da vancomicina e do metronidazol pelo E teste

Foi utilizado o E teste, PDM Epsilometer (AB BIODISK, Solna, Sweden), técnica quantitativa de difusão em agar, baseada num gradiente de antibiótico pré-definido, que determina, de modo individual, a susceptibilidade de determinada bactéria a determinados antibióticos (Bolmstrom *et al.*, 1989). Resumidamente, colónias isoladas em gelose de sangue, com 24 h de crescimento, foram suspensas em caldo Schaedler, até uma turvação equivalente à unidade 0.5 da escala de McFarland e depois inoculada em placas de agar Schaedler utilizando a técnica de espalhamento com zaragatoa. Após absorção do excesso de inóculo, a tira do E teste, contendo o gradiente exponencial de vancomicina ou metronidazol, foi aplicado sobre a placa. Após uma incubação de 24 h a 37°C, em anaerobiose, tempo necessário para se obter um crescimento visível, procedeu-se à leitura da CIM (mg/L), dada pelo ponto de intersecção entre a zona de inibição de crescimento e a tira do E teste com escala de concentrações.

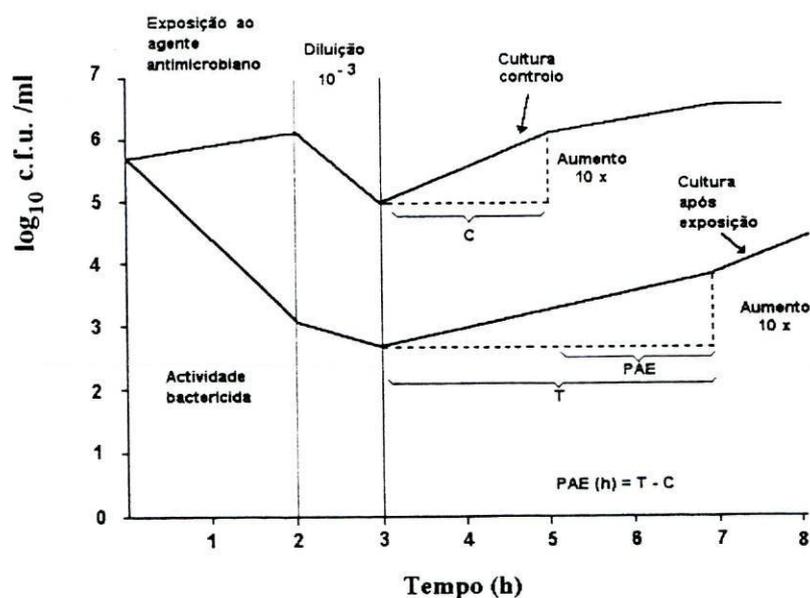
11. Determinação do Efeito Pós-Antibiótico (PAE) da vancomicina e do metronidazol

Foi determinado o PAE da vancomicina na estirpe ATCC e nas estirpes clínicas CD1, CD22 e CD8 e o PAE do metronidazol na estirpe ATCC, utilizando-se uma adaptação da técnica de meio líquido descrita por Craig & Gudmusson (1986). Cada experiência de PAE foi repetida em diferentes dias, no mínimo três vezes para a estirpe ATCC, e uma vez para as estirpes clínicas. Resumidamente, 0.5 ml de uma cultura em fase de crescimento logarítmico (10^6 - 10^7 c.f.u./ml) foram adicionados a 0.5 ml de um novo caldo Schaedler, tendo-se adicionado posteriormente o agente antimicrobiano numa concentração final de 5x, 7.5x, 10x, 15x, 30x e 45x o CIM para a vancomicina e 5x, 10x e 40x o CIM para o metronidazol.

Seguiu-se um período de exposição ao agente antimicrobiano de 1 h ou 2 h a 37°C. Terminado este período procedeu-se à remoção da droga através de uma diluição de 10^{-3} ,

realizada em 100 ml de novo caldo Schaedler, tendo-se seguido a reincubação a 37°C. Uma cultura controlo, não exposta ao agente antimicrobiano, foi processada de modo semelhante. Um controlo adicional, constituído por uma cultura não exposta ao agente antimicrobiano diluída em caldo Schaedler contendo uma diluição de 10^{-3} da mais alta concentração da droga usada no ensaio, foi introduzido de modo a assegurar que a diluição após a exposição à droga era suficiente para evitar qualquer actividade antibacteriana pela droga residual.

Em todas as culturas foi realizada uma contagem de células viáveis (c.f.u./ml) antes da exposição ao agente antimicrobiano, imediatamente após a diluição e depois hora a hora até as culturas se mostrarem turvas. Para tal, diluições seriadas (10^{-1}) das amostras foram realizadas em NaCl 0.9%, reduzido no mínimo 1 h, tendo 0.1 ml de cada diluição sido semeados em duplicado em placas de gelose de Schaedler. A contagem das colónias foi feita após uma incubação de 18-24 h a 37°C, em anaerobiose. O PAE foi calculado a partir das curvas de crescimento pela seguinte fórmula $PAE (h) = T - C$, em que T representa o tempo necessário para que a contagem de c.f.u., na cultura exposta à droga aumente de $1 \log_{10}$ acima da contagem observada imediatamente após a remoção da droga e C o tempo necessário para que a contagem de c.f.u., na cultura controlo não exposta aumente de $1 \log_{10}$ acima da contagem observada imediatamente após a realização do mesmo processo usado na cultura teste para remoção da droga (ver Esquema).



Esquema. Representação gráfica da determinação do PAE (ver texto para detalhes). Adaptado de Bush *et al.*, 1989

11.1. Estudo morfológico e ultraestrutural das bactérias em fase de PAE

Células provenientes das culturas expostas às doses supra-inibitórias de vancomicina ou metronidazol, utilizadas no estudo do PAE, foram estudadas por microscopia óptica (ver 6.1.) e processadas para microscopia electrónica (ver 6.2.), imediatamente após terem terminado os períodos de exposição aos agentes antimicrobianos. As culturas controlo, não expostas, foram estudadas de igual modo.

12. Detecção da toxina A

Foi utilizado o sistema automático MiniVIDAS (bioMérieux), o qual utiliza o método imunoenzimático com uma detecção final por imunofluorescência (metodologia ELFA-Enzyme Linked Fluorescent Assay).

O teste VIDAS para a detecção da toxina A de *C. difficile* (VIDAS CDA) é composto por dois dispositivos (que ocupam durante a reacção posições diferentes), um que constitui a fase sólida (FS) e que se encontra sensibilizado com um anticorpo anti-toxina A *C. difficile* e outro constituído por uma tira reaccional dupla (tira reacção e tira referência) contendo uma série de cúpulas seladas, dispostas paralelamente, onde se encontram todos os reagentes. Após a colocação da amostra nas cúpulas respectivas, a reacção vai decorrer de modo automático, iniciando-se pela diluição da amostra e pelo contacto desta com a FS sensibilizada. Após lavagem, para eliminação dos componentes não ligados, um anticorpo monoclonal de ratinho anti-toxina A é introduzido na FS ligando-se a toda a toxina A que aí tenha ficado ligada. Segue-se nova lavagem e o contacto da FS com o conjugado constituído por um anticorpo anti-ratinho ligado à fosfatase alcalina. A lavagem final precede a introdução do substrato fluorescente, o 4-metil-lumbeliferil fosfato. A retenção da fosfatase na FS, nas amostras positivas, vai levar à hidrólise do substrato originando um produto fluorescente, o 4-metil-lumbeliferona. A tira de referência contém na cúpula correspondente ao anticorpo monoclonal anti-toxina A, fluido ascítico de ratinho normal. Esta tira

determinará o grau de ligação não específica originada pela amostra. Terminado o teste (ao fim de 2.5-3 h) os resultados são analisados e registados automaticamente.

Embora o teste VIDAS CDA vise a detecção da toxina directamente a partir das fezes, foi no nosso caso adaptado à sua detecção no sobrenadante das culturas das várias estirpes isoladas de *C. difficile*. Assim culturas, em meio de TSB, com 6-7 dias de crescimento foram submetidas a uma centrifugação de 13 000 rpm (microcentrífuga Sigma-202 MC) durante 10 min tendo sido submetido ao teste apenas 0.6 ml deste sobrenadante. A estirpe toxigénica ATCC 9689, submetida a tratamento idêntico, foi também testada com a finalidade de se avaliar a sensibilidade e a especificidade desta adaptação.

13. Análise estatística de resultados

Foi usado o teste de Student's, com níveis de significância de 0.05 ou 0.01.

Resultados

Estudo ultraestrutural e fisiológico de *C. difficile*

Parte I

Os resultados apresentados foram obtidos predominantemente com as estirpes ATCC 9689 e CD1. As estirpes CD2, CD11, CD22, CD24, CD26, CD34, CD41, CD50, CD55, CD56, CD60, CD74, CD89, CD101, CD145, CD146, CD147, CD148 foram apenas utilizadas no estudo das proteínas da S-layer.

1. Caracterização ultraestrutural de células em fase exponencial

Foram estudadas células provenientes de culturas exponenciais em meio Schaedler e cuja fixação se realizou segundo os processos referidos.

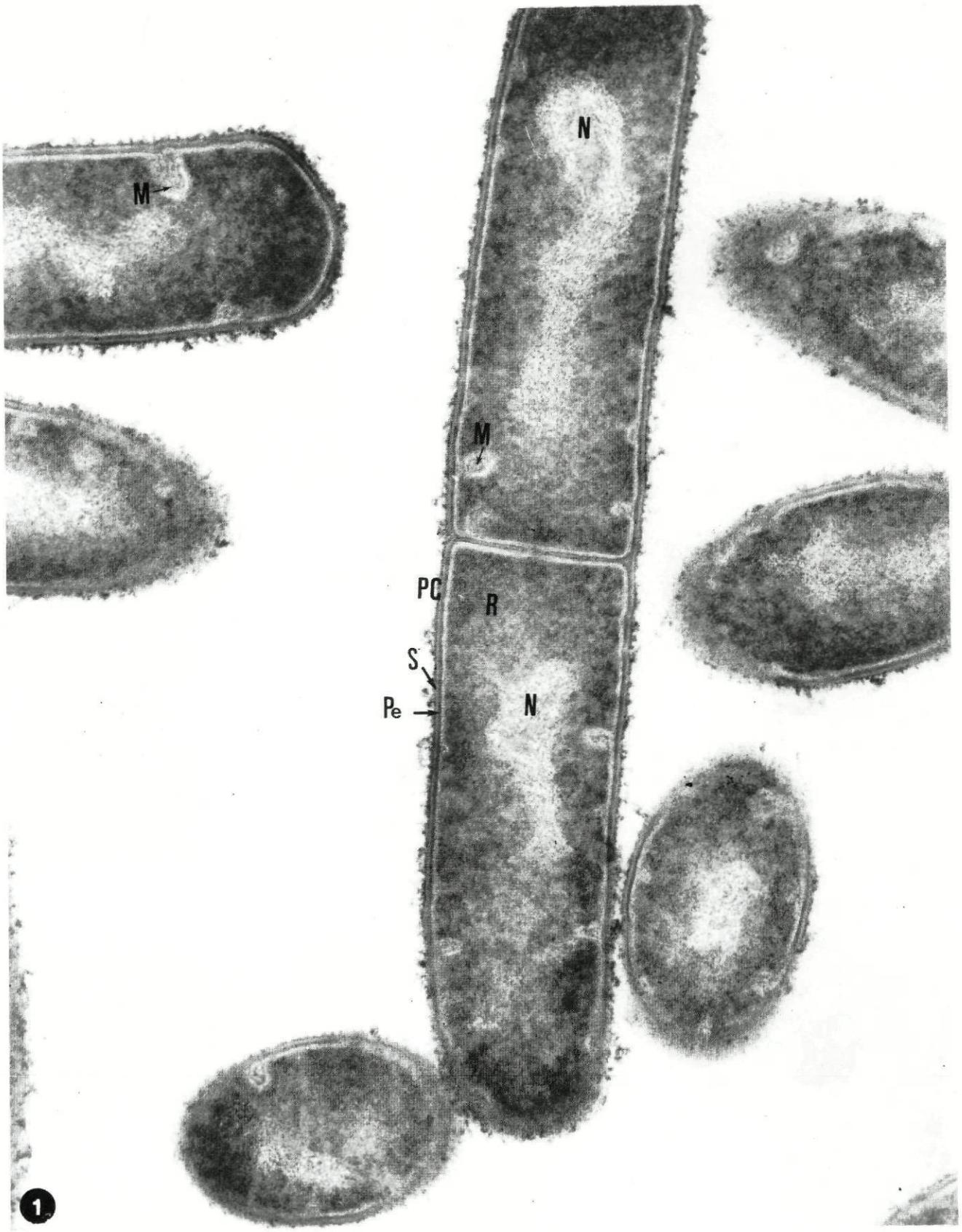
1.1. Parede celular

A observação de cortes ultrafinos por microscopia electrónica revelou a presença de uma parede celular complexa, constituída por duas camadas electronodensas (Figs 1, 5, 7 e 8). A camada imediatamente acima da membrana citoplasmática, referente à matriz de peptidoglicano, com uma espessura média de $19.6 \pm 3.5 \text{ nm}$ apresentou maior densidade aos electrões que a camada mais superficial, S-layer com cerca de $17.5 \pm 3.4 \text{ nm}$. Esta diferença de densidade electrónica apresentada pelas duas camadas apareceu associada às condições de fixação (ver 2.1.).

1.2. Membrana citoplasmática

A estrutura trilaminar assimétrica da membrana citoplasmática, perfil típico das bactérias Gram-positivo aeróbias-anaeróbias facultativas, nem sempre foi bem evidente em *C. difficile*, sendo a sua visualização dependente das condições de fixação (ver 2.1.). Nos casos em que se conseguiu uma boa preservação da membrana citoplasmática, o folheto

Fig.1. Aspecto ultraestrutural de células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler, fixadas com OsO₄/GAFACA. Notar a presença das duas camadas electronodensas da parede celular (PC); a camada correspondente ao peptidoglicano (Pe) apresenta maior densidade electrónica que a S-layer (S). São claramente visíveis os ribossomas (R), o nucleóide (N) com aspecto fibrilar e os mesossomas (M). Ampliação 45.000 x.



externo, subjacente à parede celular, apresentou-se espesso e bastante electronodenso, enquanto que o folheto interno apareceu com uma densidade aos electrões muito reduzida, dificultando a visualização da estrutura tripla assimétrica da membrana (Fig.2). Os dois folhetos da membrana tornaram-se, no entanto, bem visíveis em células em lise, embora com um perfil simétrico (Fig.3). Nestas foi também possível evidenciar um espaço periplásmico, dificilmente detectável nas células normais, devido à justaposição do folheto externo da membrana citoplasmática à parede celular.

1.2.1. Detecção ultraestrutural de componentes PAS-positivo

Células provenientes de gelose de sangue foram submetidas a tratamento pela técnica de Thiéry para a detecção de polissacáridos. A exposição à tiosemicarbazida variou de períodos de 2-48 h. Apenas exposições superiores a 28 h foram capazes de revelar componentes PAS-positivos a nível do folheto externo da membrana citoplasmática (Fig.4). Foi também visível a presença de componentes PAS-positivos no septo esporal. A nível da parede celular, nomeadamente na S-layer, não se conseguiu detectar polissacáridos pela técnica de Thiéry.

1.3. Citoplasma e nucleóide

O citoplasma bacteriano apresentou-se formado por numerosos grânulos, electronodensos, com características ultraestruturais de ribossomas e na parte central o nucleóide, zona correspondente ao DNA bacteriano, tomou o aspecto de uma estrutura fibrilar com menor densidade electrónica que o citoplasma envolvente (Figs 1, 5).

Em cortes favoráveis foi vulgar, em células em fase exponencial crescimento, a visualização de duas regiões nucleares (Fig.5).

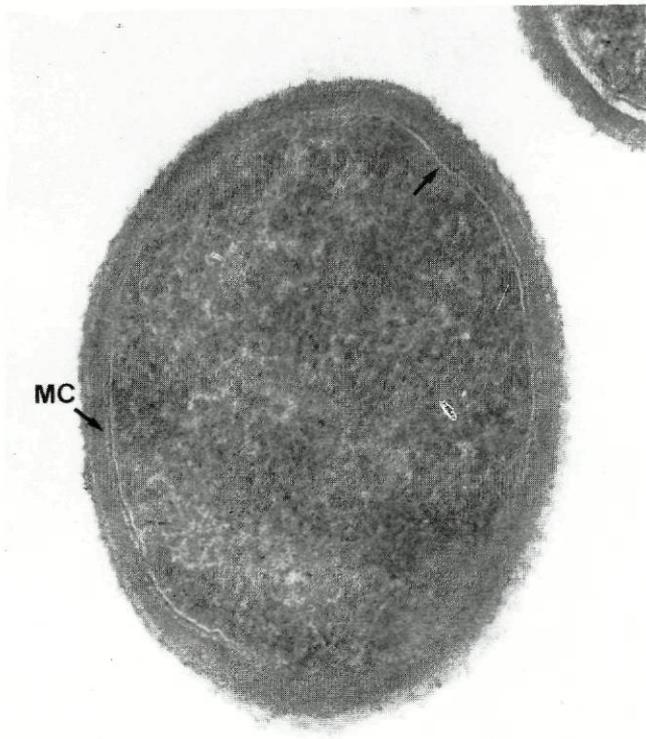
Fig.2. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes do meio sólido *C. difficile* Agar Base, fixadas com GAFACA/OsO₄. Notar a presença do folheto externo (seta) da membrana citoplasmática (MC), bastante electronodenso, subjacente à parede celular. O folheto interno da membrana citoplasmática é pouco visível. Ampliação 116.000 x.

Fig.3. *C. difficile*, estirpe CD1, proveniente de uma cultura do meio sólido *C. difficile* Agar Base, fixada com GAFACA/OsO₄. Os dois folhetos da membrana citoplasmática (MC) bem visíveis nesta célula em lise exibem um perfil simétrico. Notar também a presença do espaço periplásmico (> <). Ampliação 116.000 x.

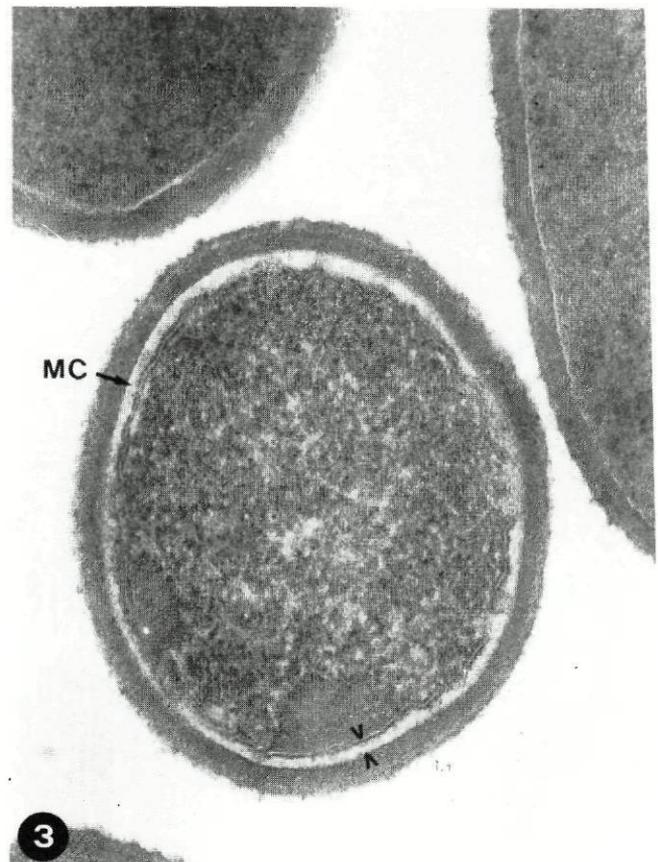
Fig.4. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de gelose de sangue, submetidas à detecção de polissacáridos pela técnica de Thiéry (tiosemicarbazida: 48 h). O folheto externo da membrana citoplasmática apresenta componentes Thiéry-positivo (setas). Notar a presença de componentes PAS-positivo no septo esporulativo de uma célula em fase II. Ampliação 52.000 x.

Fig.5. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler fixadas com OsO₄/GAFACA. Notar a presença nítida das duas camadas electronodensas da parede celular (PC); a camada correspondente ao peptidoglicano (Pe) apresenta maior densidade electrónica que a correspondente à S-layer (S). São claramente visíveis os ribossomas (R) e os nucleóides (N) com aspecto fibrilar. Reparar na má preservação da membrana citoplasmática (MC). Ampliação 55.000 x.

Fig.6. *C. difficile*, estirpe CD1, após coloração negativa pelo ácido fosfotúngstico -"negative staining". Notar a presença dos flagelos e a sua disposição peritrica. Ampliação 22.000 x.



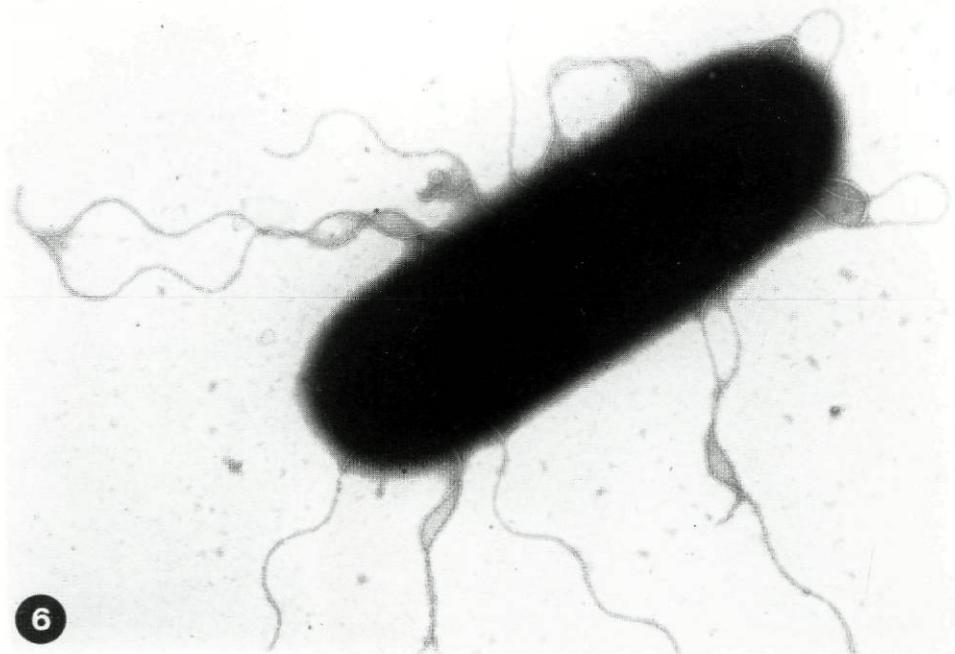
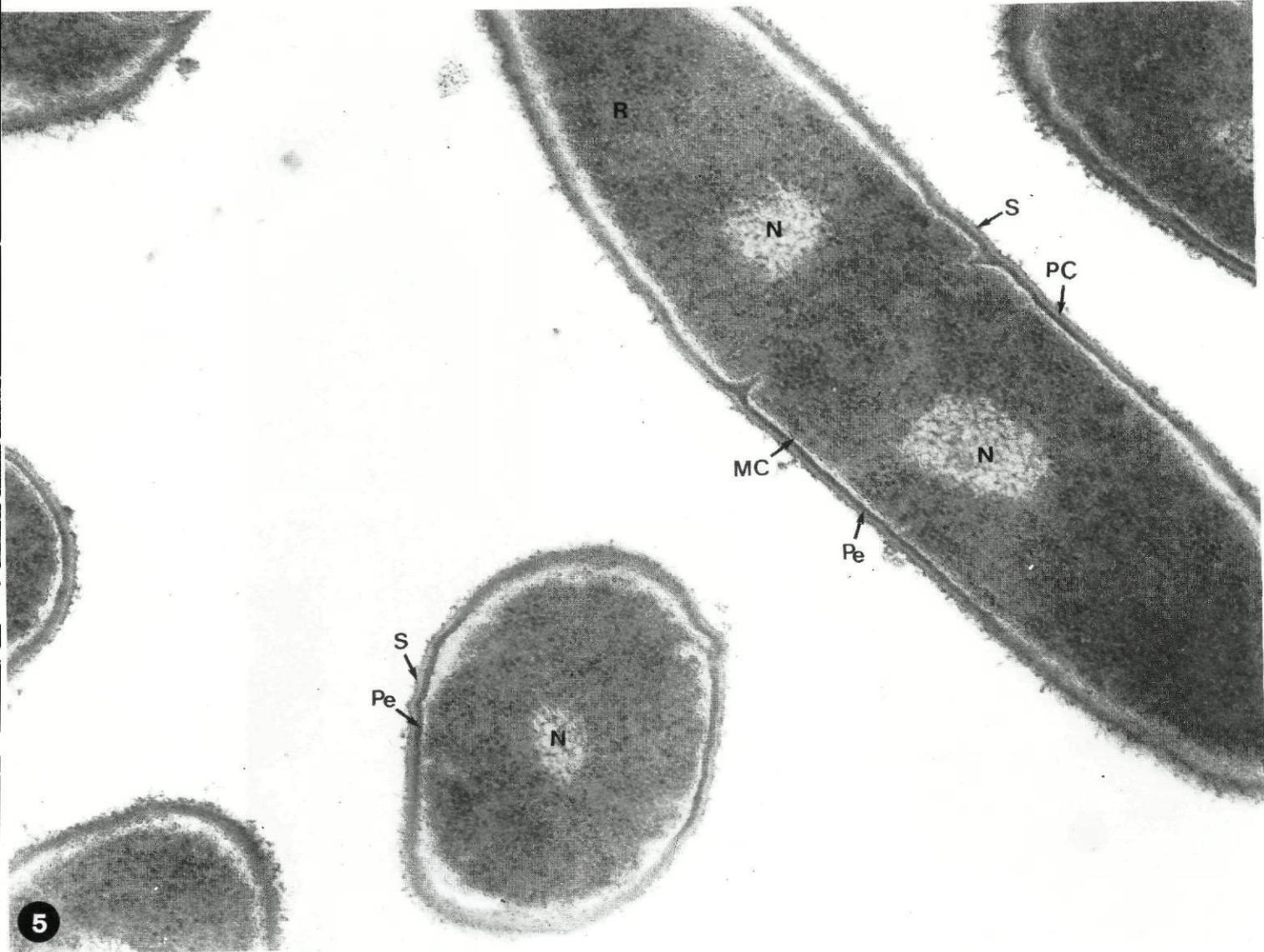
2



3



4



1.4. Flagelos

A coloração negativa de *C. difficile* pelo ácido fosfotúngstico visualizou a presença de flagelos, os quais apresentaram uma disposição peritrica e uma espessura média de 15.8 ± 2.2 nm (Fig.6)

2. Influência das condições de fixação na ultraestrutura das formas vegetativas

Durante o processamento das células para microscopia electrónica, pela técnica dos cortes ultrafinos, foram utilizados dois processos de fixação, nomeadamente GAFACA/OsO₄ e OsO₄/GAFACA, tendo-se nalguns casos iniciado estes processos em condições de anaerobiose (ver Material e Métodos).

A influência destas condições de fixação, na ultraestrutura da célula bacteriana, foi analisada quer em células provenientes de meio líquido quer em células crescendo à superfície de meios sólidos.

2.1. Células provenientes de meio líquido

As observações realizadas em células de uma cultura exponencial em caldo Schaedler foram as seguintes:

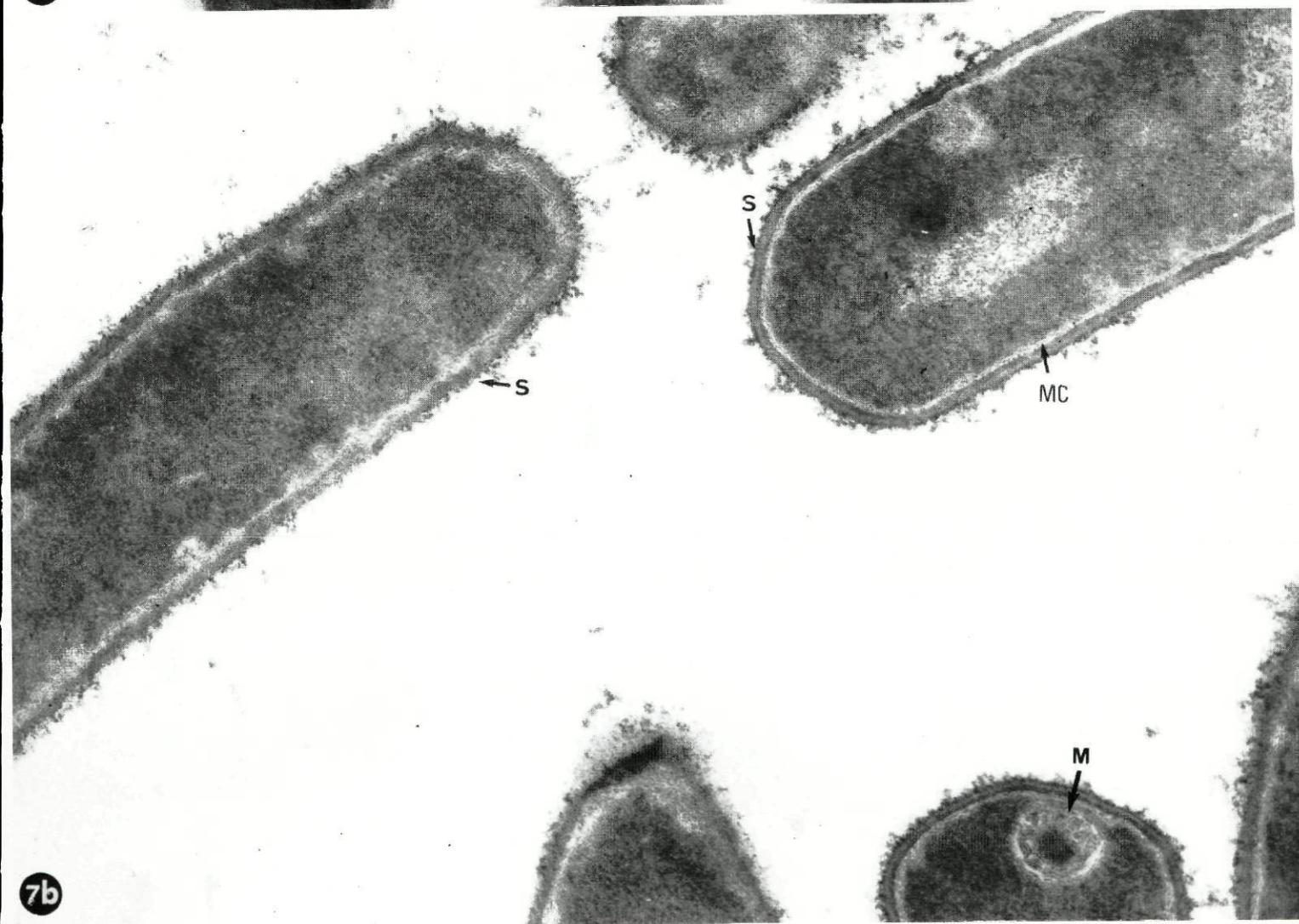
(i) aparecimento de mesossomas nas células fixadas com OsO₄/GAFACA (Figs 7a, 7b), mais abundantes quando o processo de fixação foi precedido de uma fixação em caldo, em condições de anaerobiose (Fig.7a). Estas invaginações da membrana citoplasmática só raramente foram detectadas nas células fixadas com GAFACA/OsO₄ (Figs 8a, 8b);

Fig.7. Células de uma cultura exponencial de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, em caldo Schaedler fixadas com OsO₄/GAFACA; (a) com pré-fixação em caldo, em condições de anaerobiose; (b) sem pré-fixação em caldo, em condições de anaerobiose. São visíveis pequenos mesossomas (M), mais abundantes em (a). Um mesossoma complexo é visível em (b). A membrana citoplasmática (MC) apresenta um perfil simétrico, mas é notória a sua solubilização em certos locais. Notar o contraste das duas camadas electronodensas da parede celular (PC) e agrupamentos de ribossomas (R) bem visíveis em (a). A S-layer em (b) aparece com um aspecto fibroso. (a e b). Ampliação: (a) 58.000 x; (b) 86.000 x.

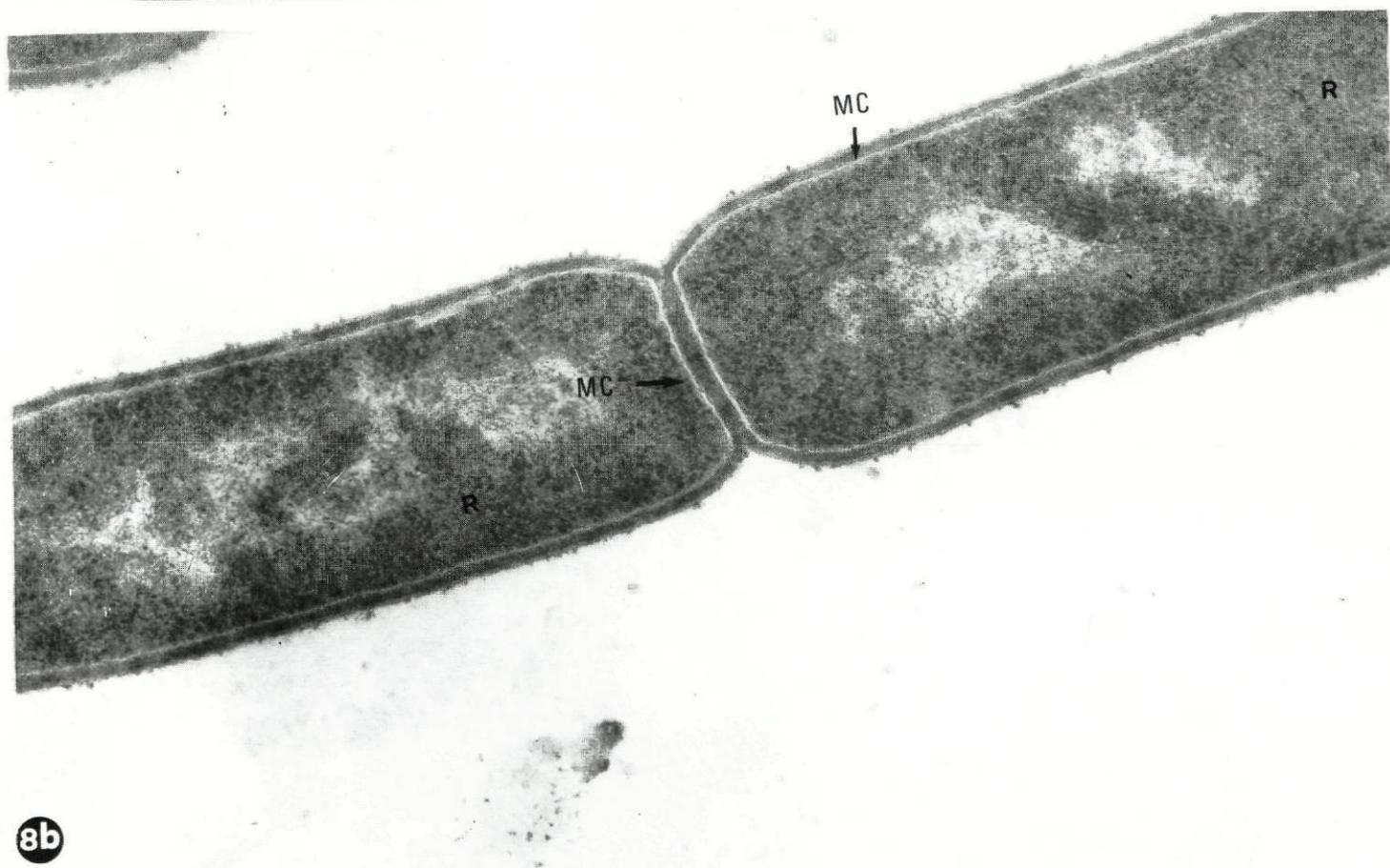
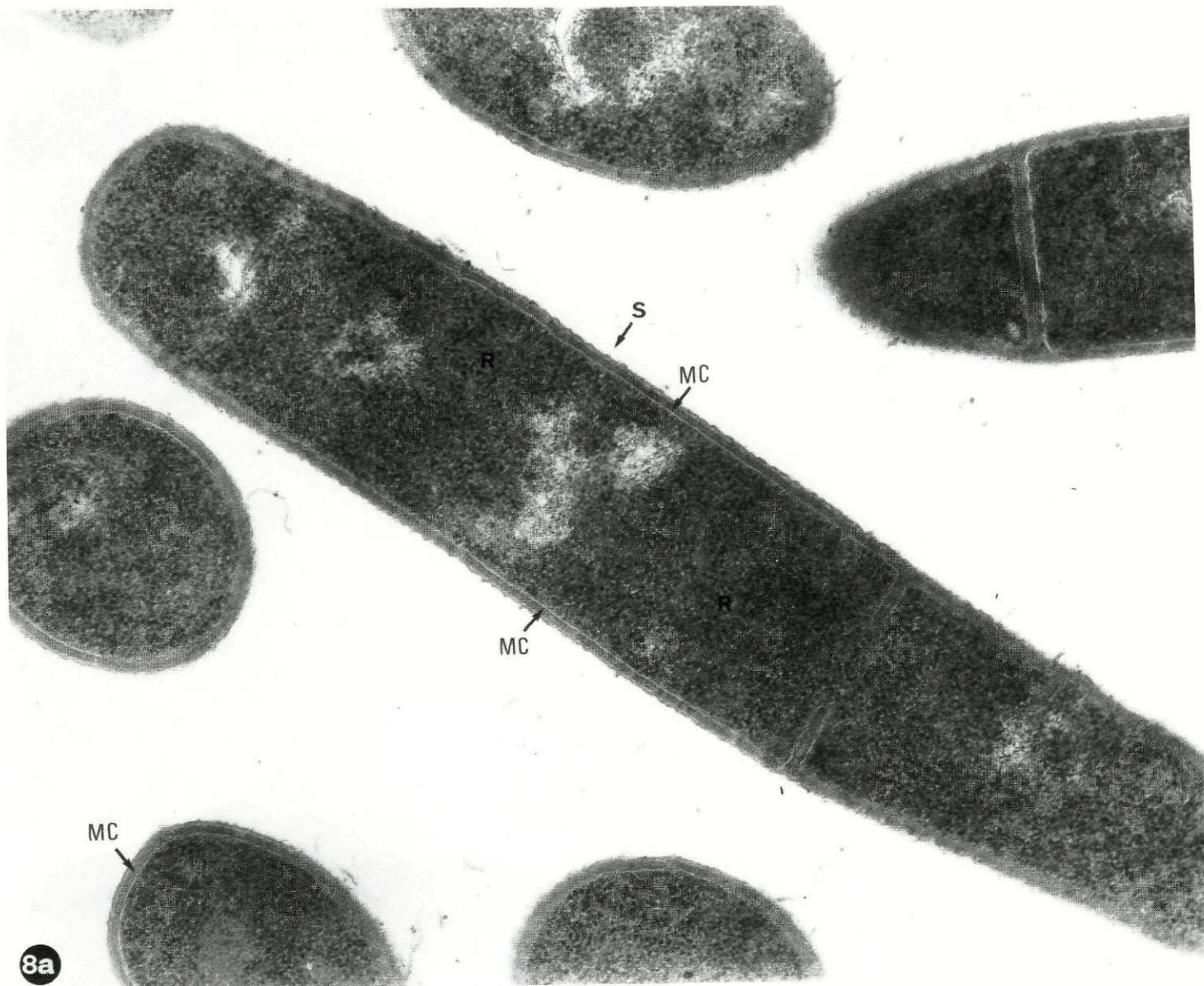
Fig.8. Como na Fig.8. mas fixadas com GAFACA/OsO₄; (a) com pré-fixação em caldo em condições de anaerobiose; (b) sem pré-fixação em caldo. Reparar no folheto externo electronodenso da membrana citoplasmática (MC), bem preservado em (a). Em (b) a membrana aparece solubilizada. A camada superficial proteica (S) aparece com um aspecto "ondulado" em (a). Os ribossomas aparecem uniformemente distribuídos pelo citoplasma sem qualquer agrupamento (a e b). Ampliação: (a) 59.000 x; (b) 80.000 x.



7a



7b



(ii) fraca preservação da membrana citoplasmática nas células fixadas com OsO₄/GAFACA (Figs 7a, 7b), evidenciada pela sua solubilização em certos locais, pela passagem do seu perfil de assimétrico para simétrico. Melhor preservação da membrana foi no entanto obtida nas células fixadas com GAFACA/OsO₄, mas apenas quando estas sofreram uma prévia fixação em caldo e em condições de anaerobiose (Fig.8a); na ausência desta, a preservação da membrana foi mal conseguida (Fig.8b);

(iii) melhor contraste entre as duas camadas electronodensas da parede celular nas células fixadas com OsO₄/GAFACA (Fig.7); fenómeno idêntico foi observado em fragmentos de parede celular. Nas amostras fixadas com OsO₄/GAFACA foi bem visível a existência de duas camadas com densidade electrónica diferente (Fig.9a), mas tal distinção não foi tão nítida nas amostras fixadas pela GAFACA/OsO₄ (Fig.9b);

(iv) a S-layer apareceu com um aspecto "ondulado" nas células fixadas com GAFACA/OsO₄ (Fig.8a) mas com um aspecto rectilíneo nas células fixadas com OsO₄/GAFACA (Fig.7a).

2.2. Células provenientes de meio sólido

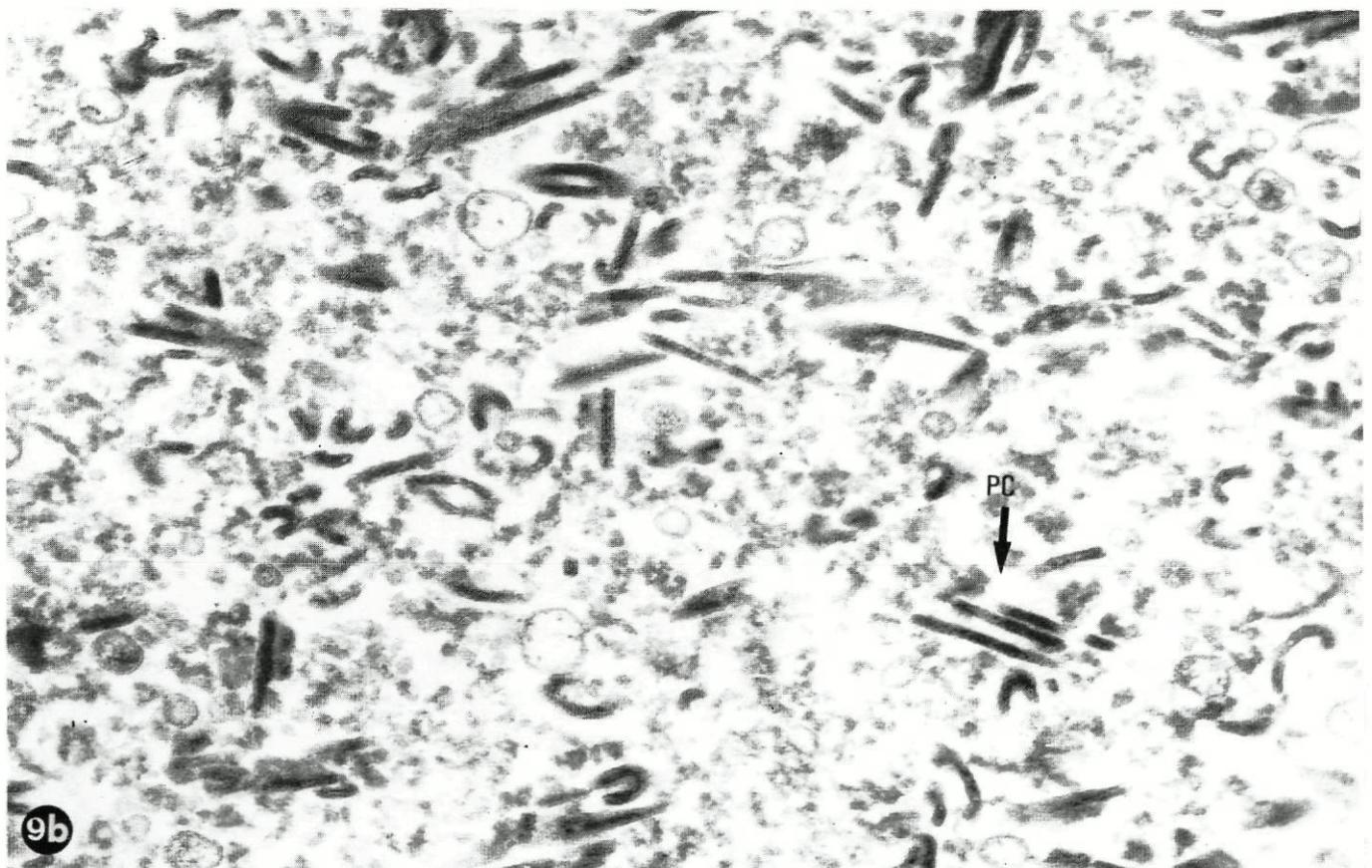
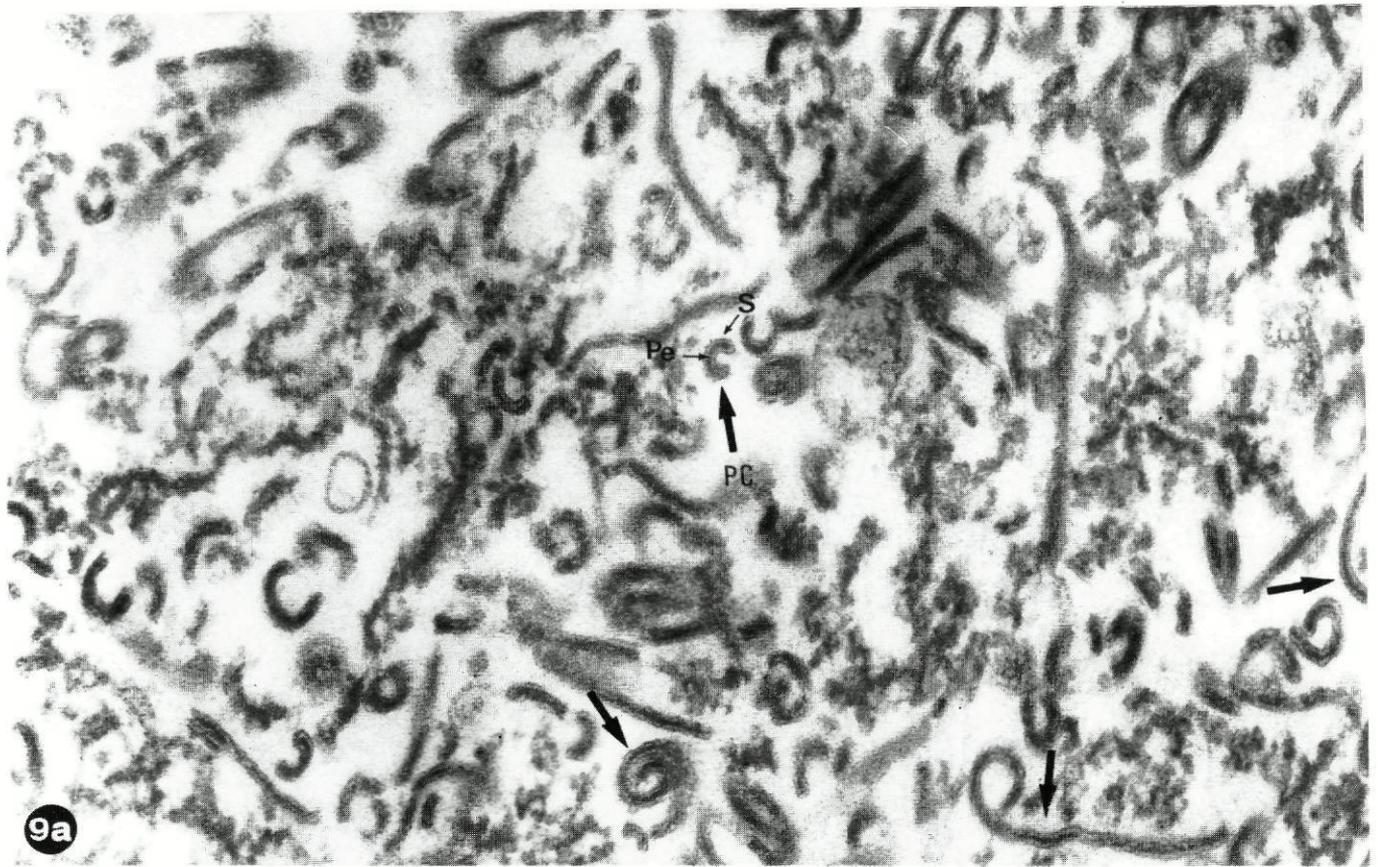
As observações, realizadas em células cultivadas à superfície de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base) com 24 h de crescimento, conduziram às seguintes conclusões:

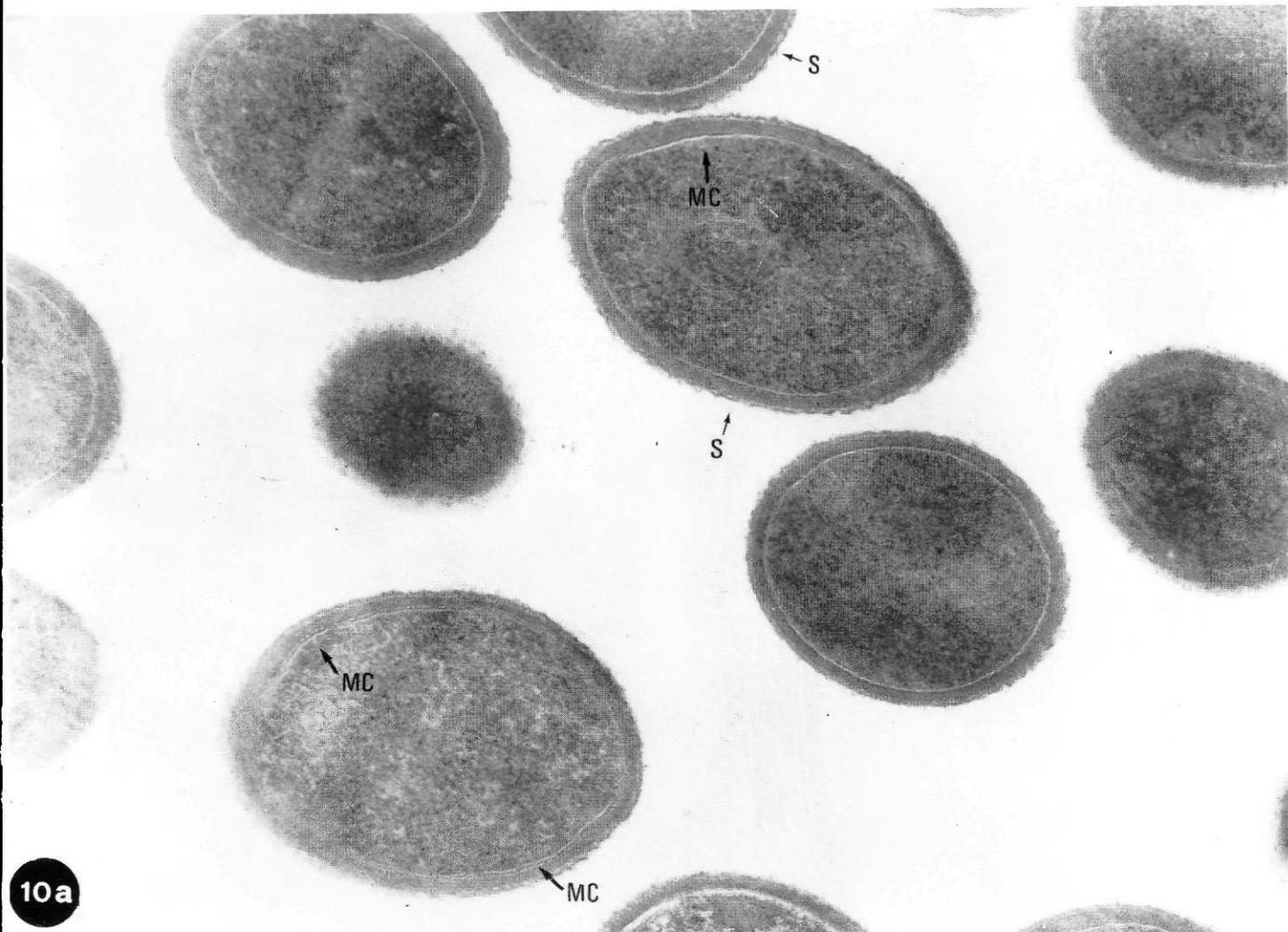
(i) raramente foram detectados mesossomas nas células fixadas com GAFACA/OsO₄ (Fig.10a); estes foram visíveis, embora em pequeno número, em células fixadas com OsO₄/GAFACA (Fig.10b);

(ii) a preservação da membrana citoplasmática foi também fraca nas células fixadas com OsO₄/GAFACA, observando-se zonas de solubilização e fractura assim como alteração do

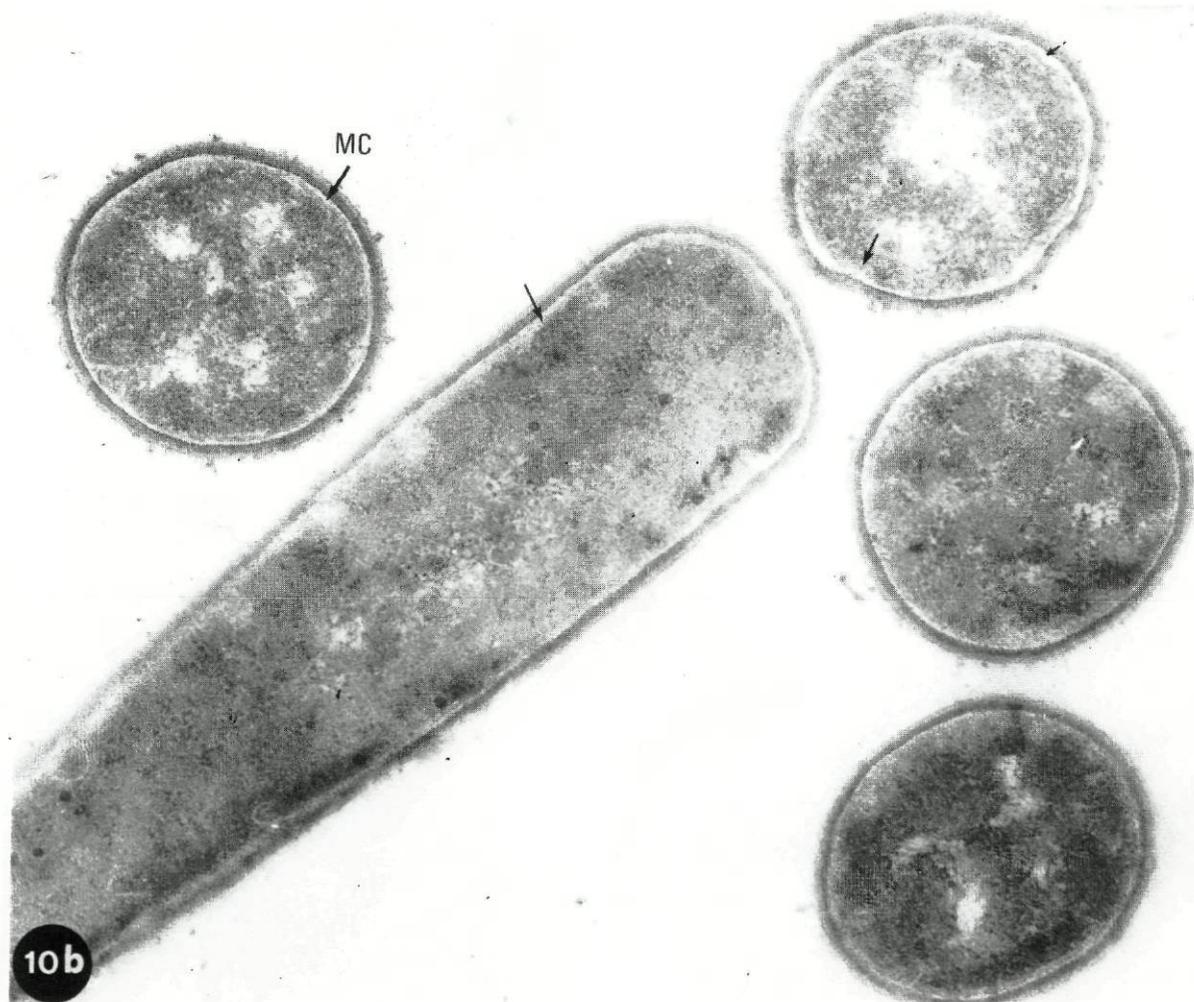
Fig.9. Fragmentos de parede celular (PC), estirpe CD1, fixados com OsO₄/GAFACA em (a) e com GAFACA/OsO₄ em (b). Notar a capacidade da S-layer (S) em se justapôr a ambos os lados da camada de peptidoglicano (Pe). Em (a) é bem visível o contraste existente entre as duas camadas electronodensas (setas), mas tal distinção não é tão nítida em (b). Ampliação: (a) 78.000 x; (b) 84.000 x.

Fig.10. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base), com 24 h de crescimento, fixadas em condições de anaerobiose, com GAFACA/OsO₄ em (a) e com OsO₄/GAFACA em (b). Em (a) é bem visível o folheto externo electronodenso da membrana citoplasmática (MC) e o aspecto ondulado da S-layer (S). Em (b) notar a presença de uma membrana citoplasmática com perfil simétrico, com locais de fractura e solubilização (setas). Ampliação: (a) 85.000 x; (b) 75.000 x.





10a



10b

seu perfil de assimétrico para simétrico (Fig.10b).Uma boa preservação foi conseguida, no entanto, com a fixação GAFACA/OsO₄, aparecendo as células com o folheto externo da membrana citoplasmática, bastante electronodenso, deixando prever uma membrana assimétrica (Fig.10a);

(iii) a diferença de densidade electrónica, das duas camadas da parede celular, foi mais evidente, nas células fixadas com OsO₄/GAFACA (Fig.10b);

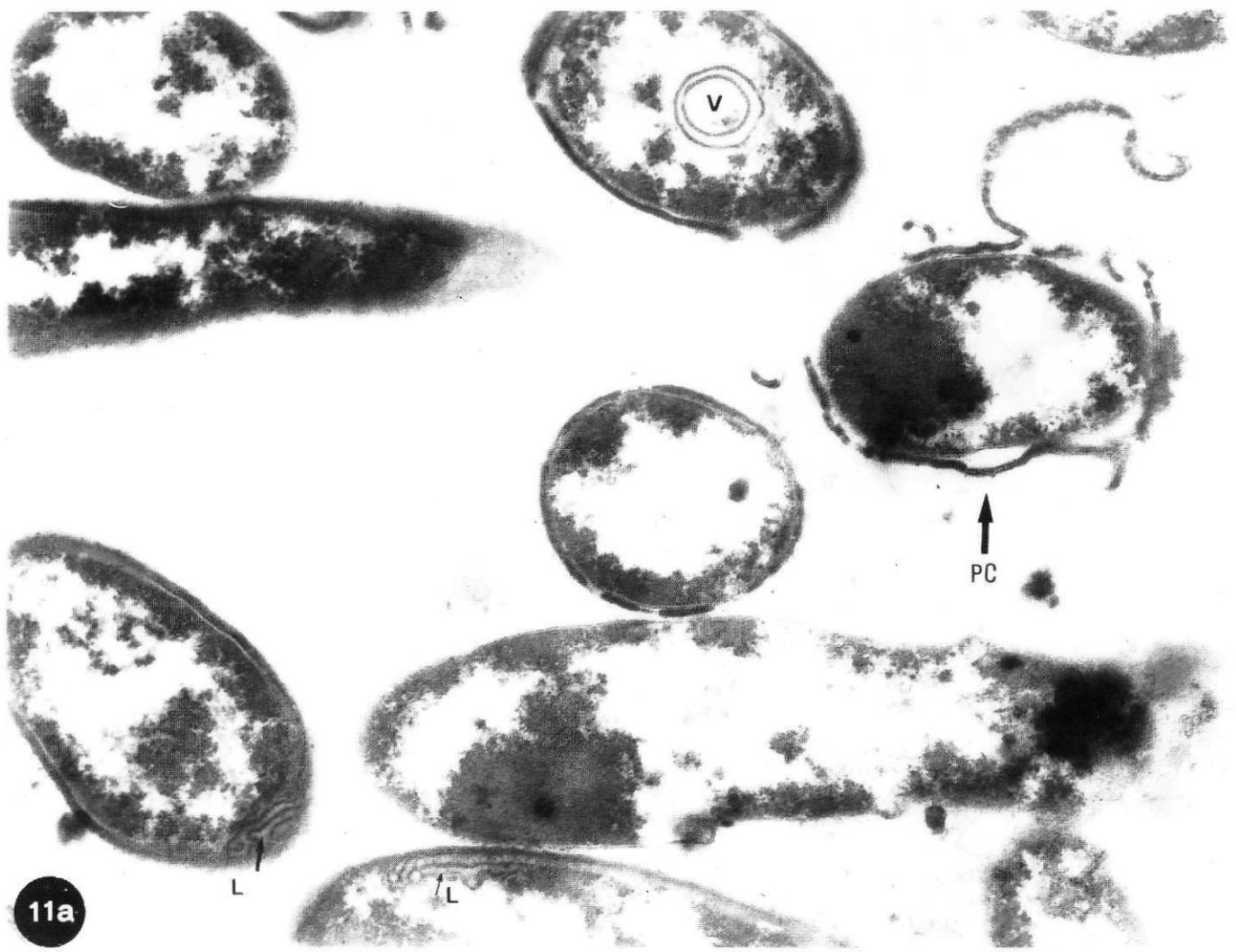
(iv) o aspecto ondulado da S-layer foi visível nas células fixadas com GAFACA/OsO₄ (Fig.10a) enquanto que nas células fixadas com OsO₄/GAFACA a S-layer apresentou um aspecto rectilíneo (Fig.10b).

3. Caracterização ultraestrutural de células em fase de declínio

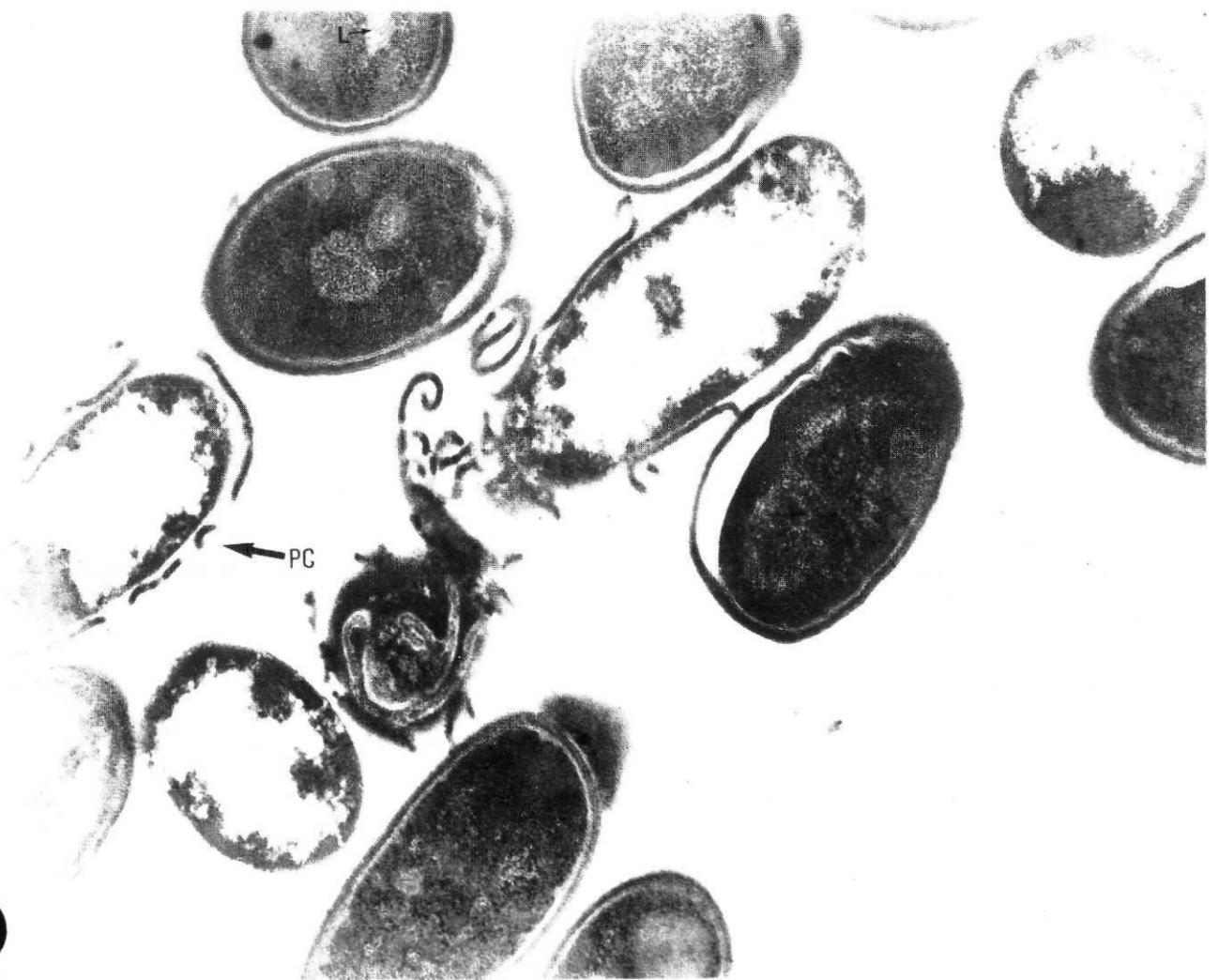
3.1. Provenientes de meio líquido

O estudo ultraestrutural de células provenientes de uma cultura líquida, em fase de declínio, revelou um predomínio de células alteradas (Figs 11a, 11b). Estas apresentaram uma ausência total de ribossomas, precipitação citoplasmática com formação de densos blocos na periferia da célula bacteriana e paredes celulares com numerosas fracturas junto da superfície bacteriana (Fig.11). Acompanhando estas alterações assistimos a uma modificação do perfil, de assimétrico para simétrico, não só da membrana citoplasmática como dos vários sistemas membranosos intra-citoplasmáticos, de configuração vesicular ou lamelar, que foram aparecendo (Figs 11a, 11b). Não obstante a presença de muitas células degradadas foram visíveis simultâneamente células com ultraestrutura aparentemente normal (Fig.11b).

Fig.11. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura em caldo Schaedler em fase de declínio (com 24 h), fixadas com GAFACA/OsO₄ em (a) e com OsO₄/GAFACA em (b). Reparar no predomínio de células em degradação. Os ribossomas já não são visíveis e na periferia do citoplasma formaram-se densos blocos. As paredes celulares (PC) fracturadas permanecem junto da superfície bacteriana. Presentes alguns sistemas membranosos de perfil simétrico com configuração vesicular (V) e lamelar (L). Ampliação: (a) 49.000 x; (b) 48.000 x.



11a



11b

3.2. Provenientes de meio sólido

Nas células provenientes de culturas sólidas o início da morte celular foi assinalado, a nível da membrana citoplasmática, por uma alteração do seu perfil de assimétrico para simétrico e pelo aparecimento de numerosas zonas de fractura, acompanhando-se de uma desorganização progressiva dos ribossomas e de uma coagulação do citoplasma que tornaram visível, em toda a sua extensão, as fibrilas de DNA (Fig.12). A parede celular, com as suas duas camadas electronodensas bem visíveis não apresentou, nesta fase, nenhum sinal de fractura. O início da degradação das paredes celulares, descrita nas células de culturas líquidas, não foi pois aqui detectada. Numa fase mais tardia de lise celular, quando as células apareceram desprovidas de grande parte do conteúdo citoplasmático, a parede deixou então de ser totalmente visualizada (Fig.13a). Nalgumas células foi possível detectar a presença de paredes celulares intactas envolvendo sistemas membranosos desorganizados (Fig.13b).

4. Caracterização ultraestrutural de células expostas ao ar

Células cultivadas à superfície de meio sólido, com 24 h de crescimento, expostas ao ar durante 1 dia (Fig.14), foram comparadas com uma cultura controlo não exposta (Fig.15). As células expostas ao ar apresentaram alterações ultraestruturais semelhantes às descritas nas células em lise. Totalmente desprovidas de parede celular, a membrana citoplasmática adquiriu um perfil simétrico ao mesmo tempo que apresentou numerosas fracturas. O compartimento intracelular sem ribossomas apresentou apenas blocos densos e compactos na periferia da célula.

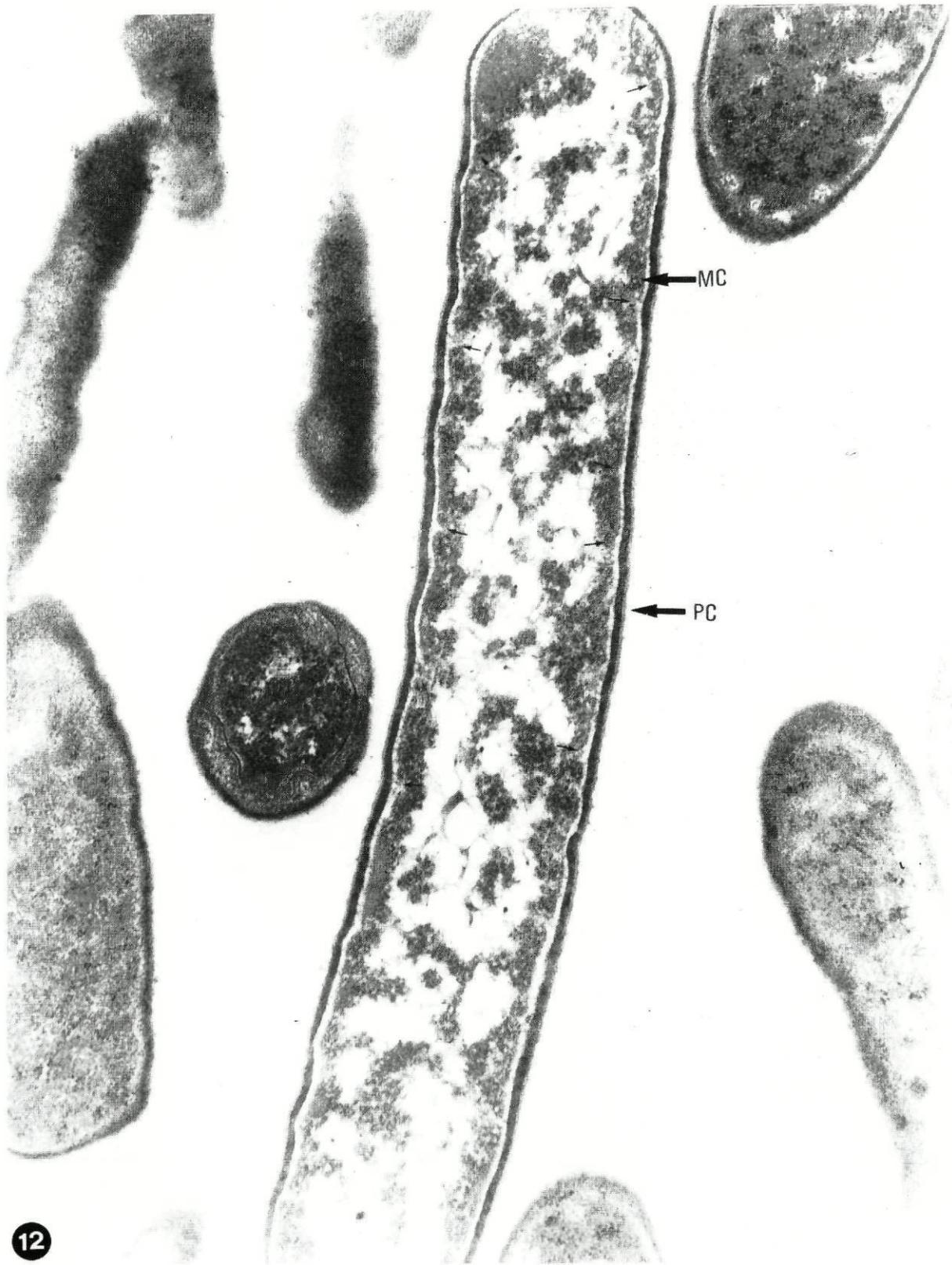
Fig.12. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base), com 3 dias de crescimento, fixadas em condições de anaerobiose, com OsO₄/GAFACA. É bem visível a coagulação do citoplasma e a desorganização dos ribossomas. A membrana citoplasmática (MC), apresenta perfil simétrico e numerosas zonas de fractura (setas). A parede celular (PC) encontra-se ainda intacta. Ampliação 62.000 x.

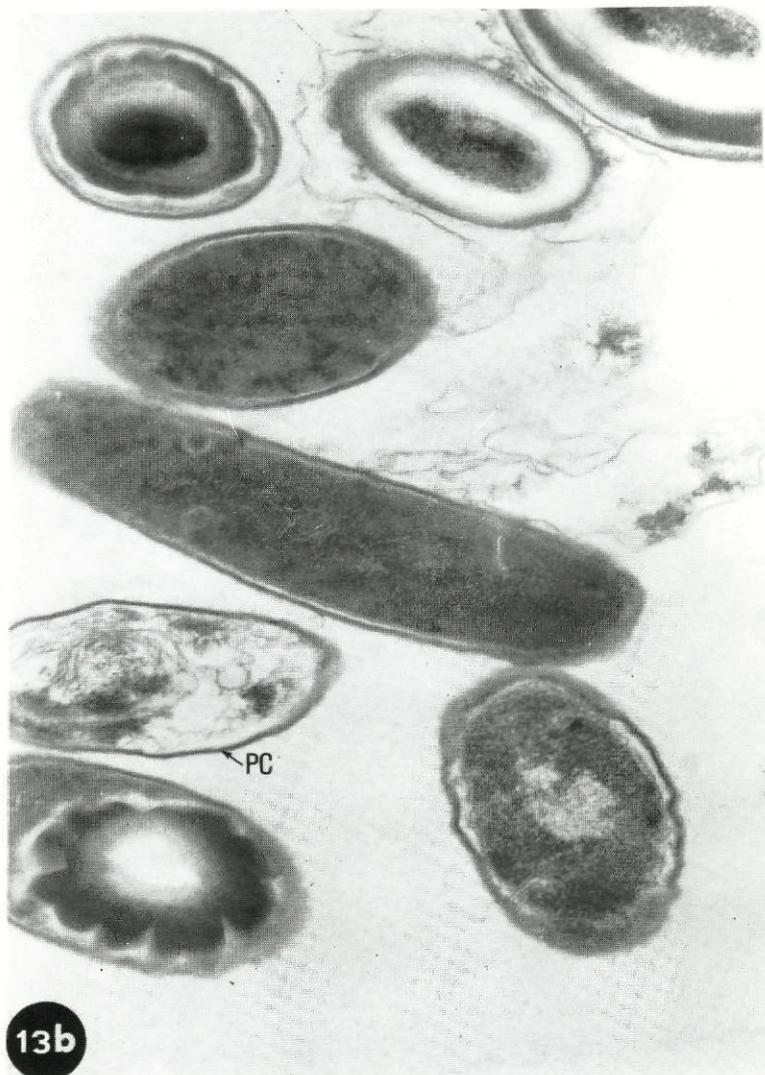
Fig.13. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base), com 6 dias de crescimento, fixadas em condições de anaerobiose, com GAFACA/OsO₄ em (a) e com OsO₄/GAFACA em (b). A maior parte das células encontram-se desprovidas de conteúdo celular. Em (a) as paredes celulares deixaram de ser visualizadas nas células em lise mas em (b) paredes celulares intactas estão ainda presentes envolvendo sistemas membranosos desorganizados. Ampliação: (a) 41.000 x; (b) 41.000 x.

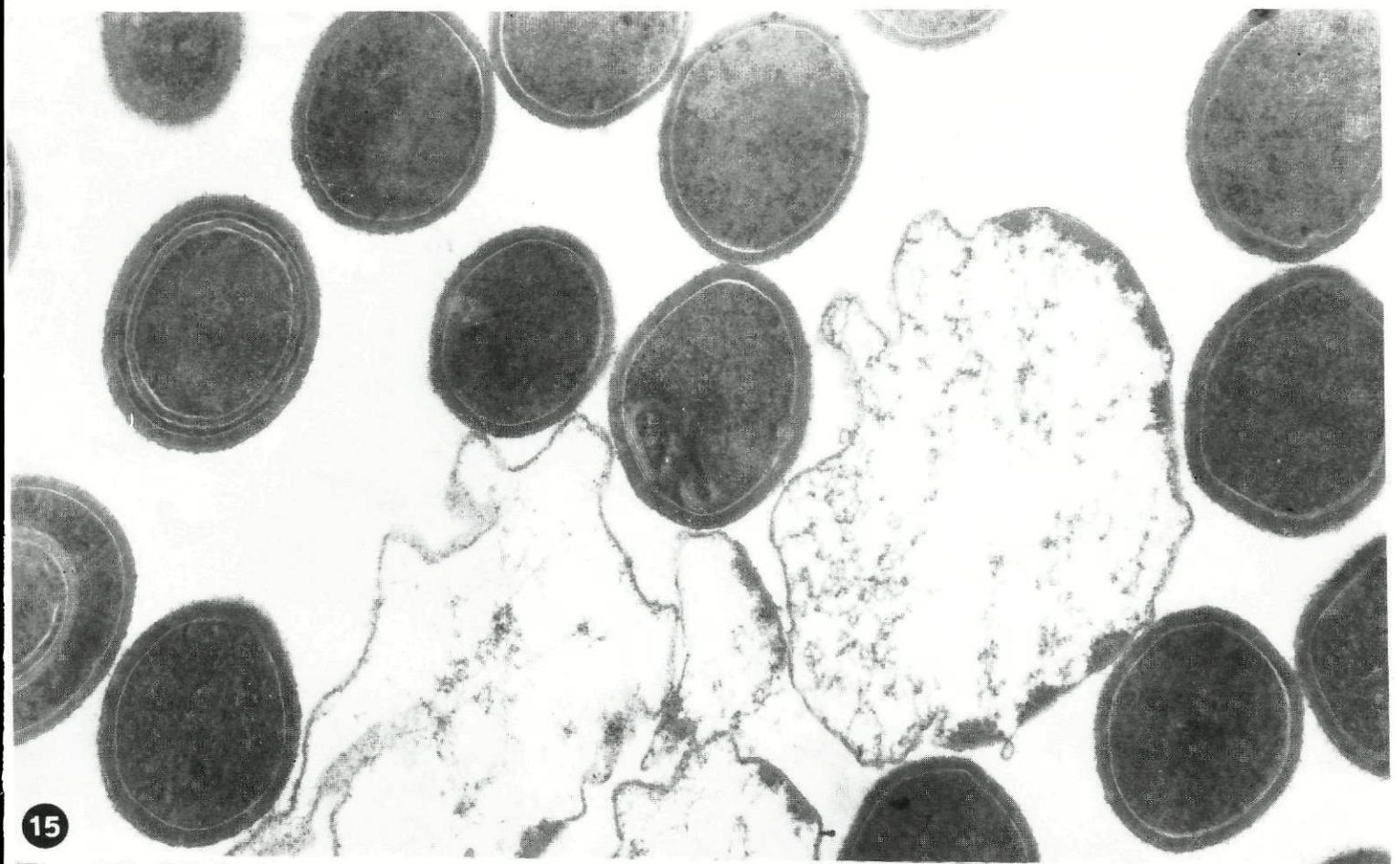
Fig.14. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base), com 24 h de crescimento, exposta ao ar durante 24 h. Fixação com GAFACA/OsO₄ São visíveis células desprovidas de conteúdo celular com membranas citoplasmáticas (MC), apresentando perfil simétrico e zonas de fractura (setas). Não são visíveis paredes celulares. Ampliação 53.000 x

Fig.15. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base), com 48 h de crescimento, fixadas em condições de anaerobiose, com GAFACA/OsO₄. Ampliação 57.000 x

Fig.16. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de meio sólido (*Clostridium difficile* Agar Base), com 3 dias de crescimento, fixadas com OsO₄/GAFACA. De notar a diferença nítida de densidade electrónica das duas camadas da parede celular (PC); a camada correspondente ao peptidoglicano (Pe) apresenta maior densidade electrónica que a correspondente à S-layer (S). A S-layer cobre completamente a superfície bacteriana, mas aparece excluída do septo de divisão. É visível uma célula em fase VI de esporulação. Ampliação 66.000 x.







15



16

5. Caracterização e isolamento da S-layer

5.1. Estudo da S-layer por microscopia electrónica

Quando da observação da parede celular por microscopia electrónica de transmissão foi visível a existência de duas camadas electronodensas, apresentando a camada superficial S-layer, menor densidade electrónica que a camada correspondente ao peptidoglicano (Figs 5, 7.a). A S-layer cobre completamente a superfície bacteriana mas aparece excluída do septo parietal de divisão celular (Fig.16).

O crescimento contínuo sob condições laboratoriais leva frequentemente ao desaparecimento da S-layer (Messner & Sleytr, 1992). No nosso caso a cultura prolongada *in vitro* de *C. difficile* não levou à perda desta estrutura. Após ter sofrido um total de 80 passagens (gelose de sangue), durante um período de 8 meses foi ainda bem visível a presença das duas camadas electronodensas (Fig.17).

5.1.1. Observação de cortes ultrafinos de paredes celulares isoladas

A observação de cortes ultrafinos de paredes celulares isoladas, previamente tratadas com Triton X-100 para remoção de membranas citoplasmáticas, mostrou basicamente uma estrutura semelhante à observada nas células intactas, à excepção de uma camada adicional, com as mesmas características da S-layer, localizada no lado oposto desta estrutura (Fig.9.a).

5.2. Análise electroforética das proteínas da S-layer

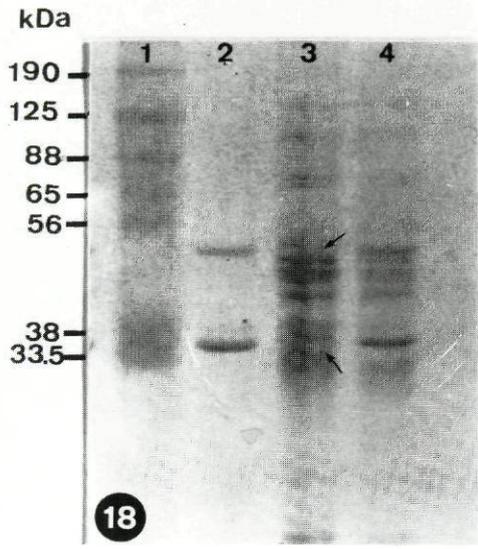
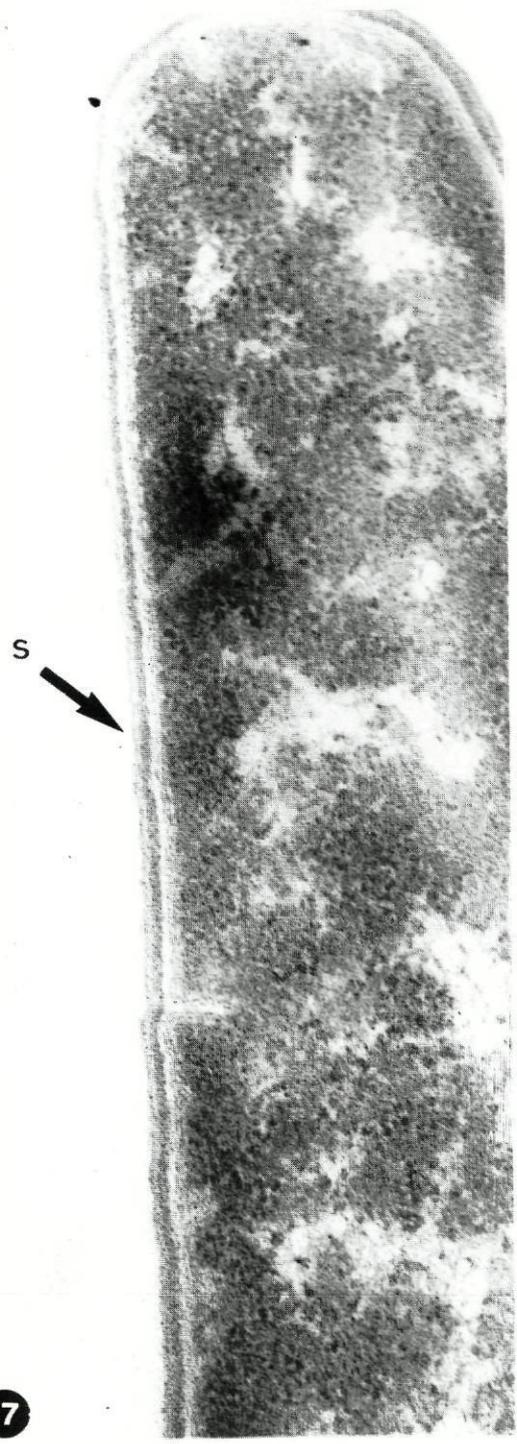
Foram submetidas a SDS-PAGE várias preparações da parede celular da estirpe ATCC 9689 de *C. difficile*: (i) o produto da extracção das paredes celulares pela ureia; (ii) o resíduo das

Fig.17. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, submetidas a 80 passagens sucessivas (160 dias) em gelose de sangue. Fixação com OsO₄/GAFACA. É bem visível a camada de menor densidade electrónica correspondente à S-layer (S). Ampliação 105.000 x.

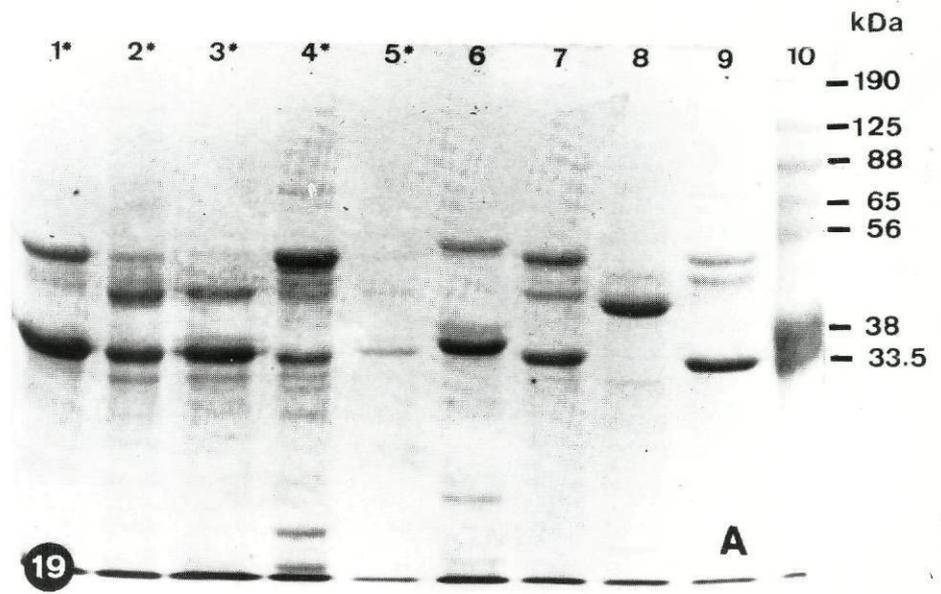
Fig.18. SDS-PAGE de várias preparações de parede celular de *C. difficile* ATCC 9689: coluna 1, marcador de PM; 2, fracção extraída pela ureia. São bem visíveis duas bandas, com 48kDa e 34kDa, correspondentes às proteínas da S-layer; 3, resíduo de parede celular resultante da extração. As duas bandas deixaram de ser visíveis (setas) ; 4, parede celular intacta, não tratada. Notar a presença das bandas 48kDa e 34kDa nesta fracção.

Fig.19. Perfis electroforéticos, obtidos por SDS-PAGE, da fracção extraída pela ureia das paredes celulares de várias estirpes clínicas de *C. difficile*. Painel A: 1, estirpe CD1; 2, CD60; 3, CD89; 4, CD145; 5, CD56; 6, CD2; 7, CD11; 8, CD26; 9, CD41; 10, Padrão de P.M. Estirpes produtoras de toxina A (*). Painel B: 1, estirpe CD101; 2, CD24; 3, CD34; 4, CD50; 5, CD55; 6, CD74; 7, CD146; 8, CD147; 9, CD148; 10, marcador de PM.

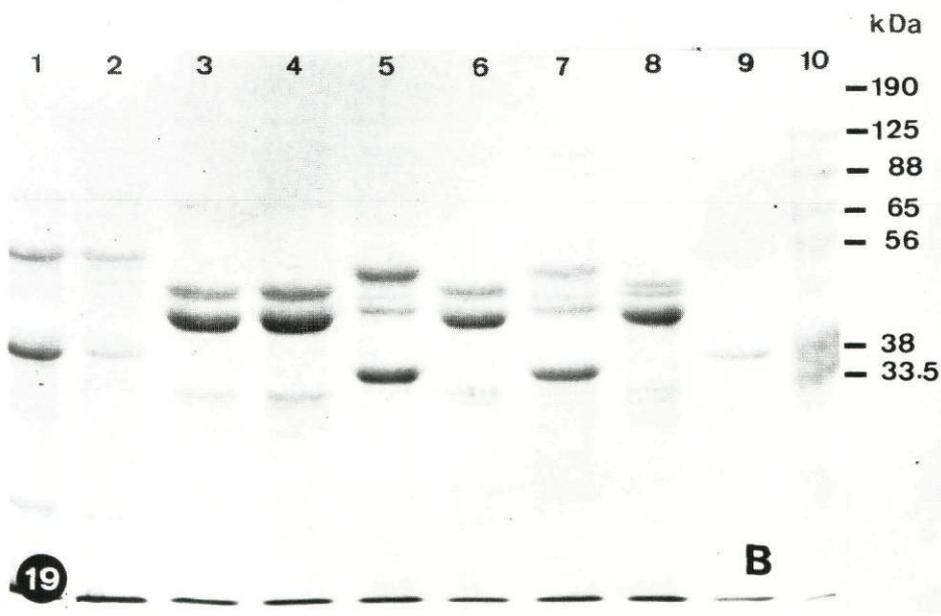
As várias estirpes podem ser agrupadas em três grupos, com base nos pesos moleculares das duas proteínas da S-layer: (i) CD1, CD145, CD2, CD11, CD41, CD101, CD24, CD55, CD146, grupo contendo proteínas com 48-50kDa e 34-35kDa, (ii) CD60, CD89, grupo contendo proteínas com 41kDa e 34kDa, (iii) CD26, CD34, CD50, CD74, CD147, grupo contendo proteínas com 47kDa e 41kDa. Reparar que estirpes toxígenas não apresentam sempre o mesmo perfil electroforético, e que o perfil destas estirpes pode ser idêntico ao de estirpes não toxígenas.



18



19



19

17

paredes celulares resultante da extracção e (iii) paredes celulares intactas não tratadas (denominada por "fracção de parede celular" em Material e Métodos). A fracção extraída pela ureia exibiu duas fortes bandas (Fig.18, coluna 2), correspondentes às proteínas da S-layer, cujo peso molecular, estimado por electroforese na presença de dodecil sulfato de sódio, foi aproximadamente 48kDa e 34kDa. Na fracção constituída por paredes celulares intactas não tratadas (Fig.18, coluna 4), foram também visualizadas, na zona correspondente às bandas descritas anteriormente, duas fortes bandas. Estas deixaram, no entanto, de ser visíveis na fracção constituída pelas paredes celulares tratadas pela ureia (Fig.18, coluna 3).

Submetemos posteriormente a SDS-PAGE o produto da extracção pela ureia das paredes celulares de algumas estirpes clínicas de *C. difficile*, isoladas de crianças (ver Anexo-Tabelas A, B, C, D). Das 18 estirpes estudadas, 5 (CD1, CD60, CD89, CD145, CD56) apresentaram capacidade de produzir toxina A (Tabela E-Anexo). Pela observação da Fig.19 verificamos que na maior parte das estirpes são visíveis duas bandas mais fortes que correspondem às duas proteínas da S-layer, mas os seus pesos moleculares apresentam uma certa heterogeneidade. Foi possível, agrupar as várias estirpes clínicas em três grupos, com base nos pesos moleculares apresentados por estas duas proteínas: (i) grupo contendo proteínas com 48-50kDa e 34-35kDa, (ii) grupo contendo proteínas com 41kDa e 34kDa, (iii) grupo contendo proteínas com 47kDa e 41kDa. Estirpes toxígenas, como as estirpe CD1 e CD145, apresentaram perfis electroforéticos idênticos ao de estirpes não toxígenas, como a estirpe CD11 ou CD41. Não foi também encontrada nenhuma correlação entre o electroforétipo das duas proteínas e a capacidade de produção de toxina A, já que estirpes toxígenas, como a estirpe CD1 e CD60 apresentaram perfis diferentes.

6. Produção e caracterização de protoplastos

6.1. Importância da glicina

Células da fase exponencial de crescimento, provenientes de caldo Schaedler com ou sem glicina (0.4%), foram adicionadas a várias soluções osmóticas contendo lisozima (1mg/ml) (Quadro I). O gradiente osmótico foi conferido em todas elas pela adição de sacarose numa concentração final de 0.5 M.

Quadro I. Produção de protoplastos de *C. difficile* pela lisozima

	Estabilizador osmótico (contendo sacarose 0.5 M)	1h	% Protoplastos		
			2h	3h	5h
A partir de caldo Schaedler <u>com</u> glicina:					
	Schaedler	1	14	31	55
	Schaedler + glicina 0.4%	3	25	41	85
A partir de caldo Schaedler <u>sem</u> glicina:					
	Schaedler	0	3	22	40
	Schaedler + glicina 0.4%	5	23	50	95
	Sch + Gly + EDTA 10 mM	1*	–	12*	13*
	T.fosfato 0.05 M pH 8.0+Gly	0	16*	–	20*
	Tris-HCl 0.05 M pH 8.0+Gly	0	0	–	0

Células na fase exponencial foram adicionadas às soluções osmóticas estabilizadoras contendo lisozima (1mg/ml). A percentagem de protoplastos foi determinada após 1, 2, 3 e 5 h após contagem, em microscópio de contraste de fase, de um total de 300 células.

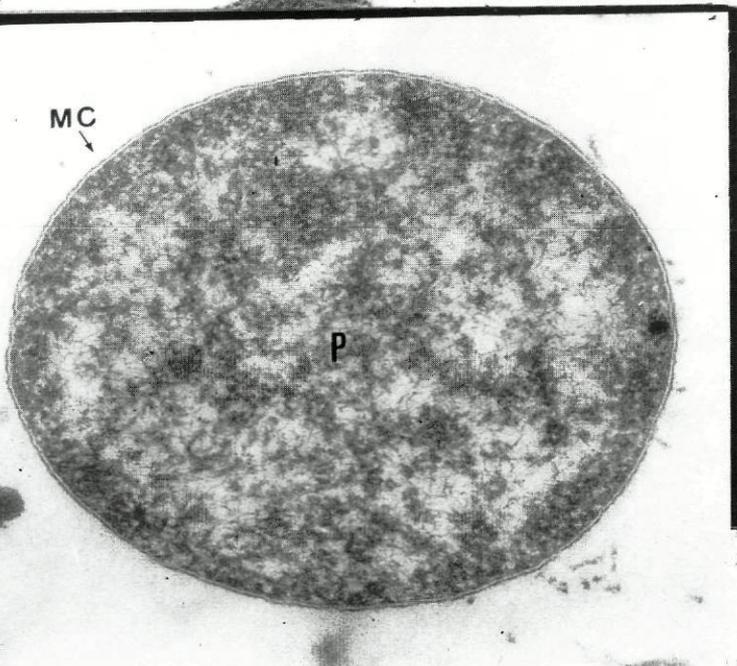
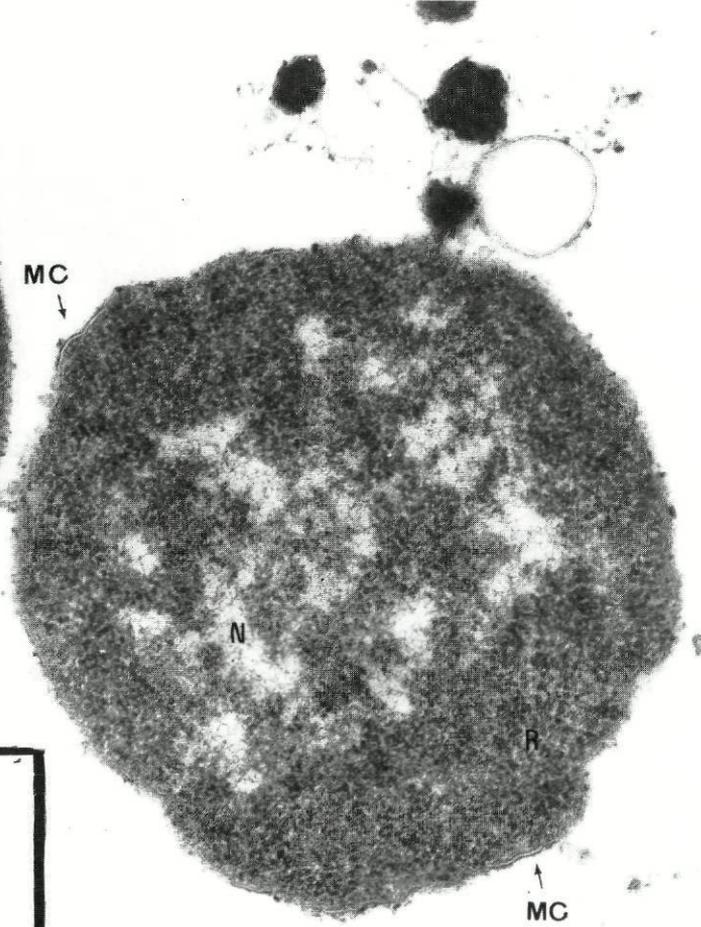
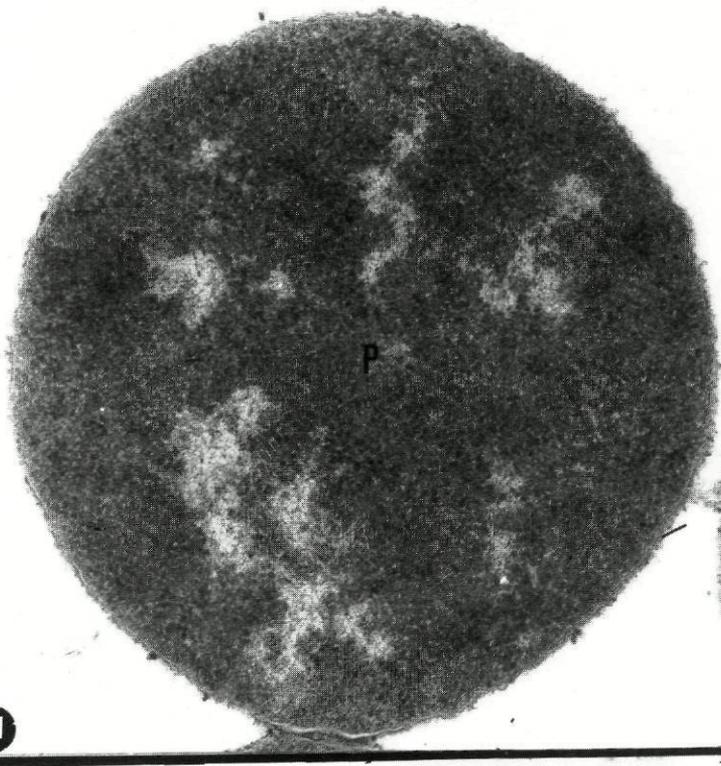
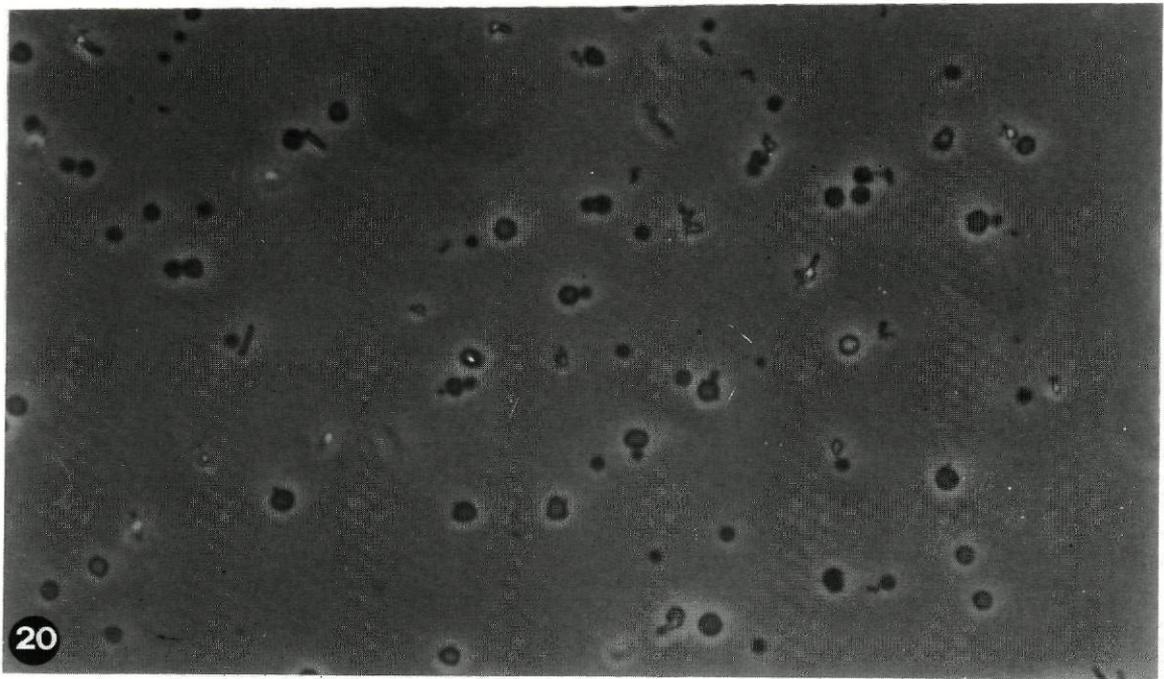
Sch = Schaedler; Gly = glicina 0.4% ; * = protoplastos pequenos e pouco refringentes

Da análise do Quadro I concluímos que o estabilizador osmótico mais eficaz, na produção de protoplastos pela lisozima, foi o constituído por caldo Schaedler, sacarose e glicina, com o qual se obtiveram taxas de formação da ordem dos 85% e 95% (Fig.20), respectivamente, a partir de células cujo crescimento se fez na presença ou ausência de glicina. Esta taxa

Fig.20. Protoplastos de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, na solução osmótica constituída por caldo Schaedler, sacarose 0.5 M e glicina 0.4%. Microscopia óptica de contraste de fase Ampliação 400 x.

Fig.21. Aspecto ultraestrutural de protoplastos (P) de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes da solução osmótica constituída por caldo Schaedler, sacarose 0.5 M e glicina 0.4%. Fixação com GAFACA/OsO₄. Notar a integridade e o perfil assimétrico da membrana citoplasmática (MC), os ribossomas (R) visivelmente distintos e o nucleóide (N) com aspecto fibrilar. Ampliação 59.000 x.

Fig.22. Como na Fig.25. mas solução osmótica adicionada de EDTA. É visível um protoplasto pequeno com membrana citoplasmática (MC) apresentando perfil assimétrico. Ampliação 59.000x.



máxima de formação foi atingida entre as 4-5 h de incubação permanecendo os protoplastos estáveis durante as 24 h seguintes. A observação dos protoplastos obtidos, por microscopia electrónica, confirmou a sua integridade, apresentando-se com uma membrana citoplasmática intacta, com perfil assimétrico, ribossomas visivelmente distintos e um nucleóide com aspecto fibrilar (Fig.21).

O pré-condicionamento das células em glicina, antes do tratamento pela lisozima, não mostrou aumentar a capacidade de produção de protoplastos, tendo-se inclusivamente obtido uma taxa de formação sensivelmente mais baixa nesta situação (85%). No entanto a sua presença na solução osmótica mostrou-se vantajosa pois ela aumentou, em ambas as situações, o número de protoplastos formados (55% versus 85% e 40% versus 95%, respectivamente).

A indução de formação dos protoplastos não foi muito rápida, tendo os primeiros protoplastos surgido apenas ao fim de 1-2h de incubação. A presença de glicina na solução osmótica parece acelerar a sua formação verificando-se uma diferença significativa no número de protoplastos formados às 2 h quando se comparam as soluções com e sem glicina (14% versus 25% e 3% versus 23%, respectivamente).

6.2. Influência do EDTA

A simples adição do agente quelante EDTA à solução osmótica constituída por Schaedler, sacarose e glicina, reduziu para 13% a taxa de produção de protoplastos (Quadro I). O estudo ultraestrutural revelou protoplastos muito pequenos os quais exibiram uma membrana citoplasmática íntegra mas com perfil simétrico (Fig.22).

6.3. Influência da S-layer

Na tentativa de averiguarmos se a S-layer, devido à sua localização periférica, seria capaz de oferecer alguma resistência à acção da lisozima, resolvemos usar, em substituição da sacarose, a ureia a qual agindo como estabilizador osmótico apresentaria também a capacidade de remover a S-layer da parede celular. Não conseguimos, nestas condições, obter protoplastos.

6.4. Influência dos tampões de incubação na acção da lisozima

Da observação do Quadro I verificamos que a solução osmótica constituída pelo tampão fosfato 0.05M, pH 8.0, sacarose e glicina não se mostrou eficaz na produção de protoplastos tendo-se obtido-se apenas uma taxa de formação da ordem dos 20%. Os protoplastos produzidos nestas condições apresentaram-se pequenos e pouco refringentes. Por outro lado a solução osmótica constituída por tampão Tris-HCl 0.05M, pH 8.0 sacarose e glicina não permitiu a obtenção de protoplastos.

7. Estudo da cinética da esporulação

Foi estudada a cinética da esporulação da estirpe CD1 no meio de esporulação de Wilson e no meio de Duncan & Strong. Tentou-se determinar, por microscopia óptica de contraste de fase, o número de células em esporulação ao longo do tempo avaliando simultaneamente o crescimento bacteriano por espectrofotometria.

As culturas, previamente submetidas a um enriquecimento de formas esporulativas (ver Material e Métodos), foram iniciadas com um número total de 2×10^7 bactérias/ml. O tratamento prévio a que foram submetidas (aquecimento a 75°C durante 20 min seguido de arrefecimento brusco a 4°C), antes da inoculação em meio novo de esporulação, inviabilizou as formas vegetativas, tendo-se assistido conseqüentemente à germinação das formas esporuladas. Por essa razão só se iniciou a avaliação do crescimento bacteriano e o estudo da cinética de esporulação após 16 h de incubação.

7.1. Esporulação em meio de Wilson

O crescimento bacteriano da estirpe CD1 e a evolução do número de células esporuladas no meio de Wilson ao longo de aproximadamente 6 dias estão representados na Fig.23. Células em esporulação começam a ser detectáveis após 20 h de incubação, coincidindo o seu aparecimento com o final da fase exponencial do crescimento bacteriano. O número de células esporuladas registado no início do processo esporulativo foi de $0.6 \times 10^7/\text{ml}$ ($6.8 \log_{10}$). A partir deste momento o número de células em esporulação foi aumentando detectando-se, após 42 h de incubação, cerca de $2 \times 10^7/\text{ml}$ ($7.3 \log_{10}$). Depois de um decréscimo verificado nas 8 h seguintes seguiu-se um novo aumento, tendo-se atingido, por volta das 70 h, o valor máximo de $2.4 \times 10^7/\text{ml}$ ($7.4 \log_{10}$). Às 137 h esse valor era ainda de $1.6 \times 10^7/\text{ml}$ ($7.2 \log_{10}$).

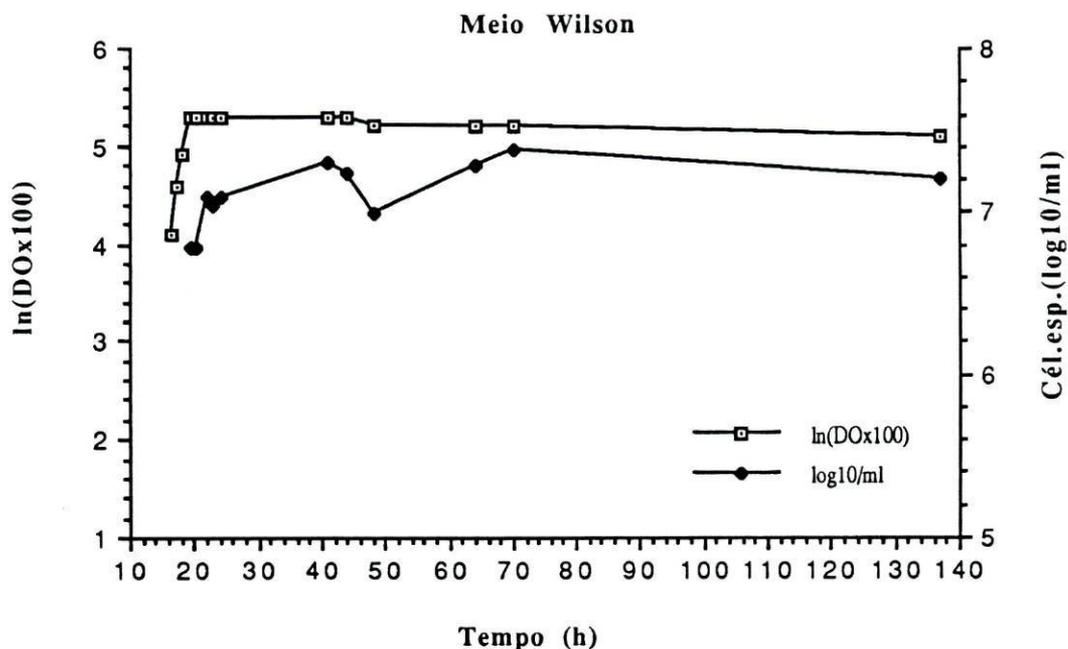


Fig.23. Curva de crescimento e cinética de esporulação de *C. difficile*, estirpe CD1, em meio de Wilson.

7.2. Esporulação em meio de Duncan & Strong.

Da observação da Fig.24, que representa o crescimento bacteriano da estirpe CD1 e a evolução do número de células esporuladas ao longo de 89 h no meio de Duncan & Strong, verificamos que o aparecimento das primeiras células esporuladas se registra após 22 h de incubação, coincidindo com o final da fase exponencial. O número células esporuladas foi de $0,5 \times 10^6$ /ml ($5,7 \log_{10}$). Este número foi sempre aumentando de modo progressivo atingindo-se, no final da incubação, valores de 2×10^7 /ml ($7,3 \log_{10}$).

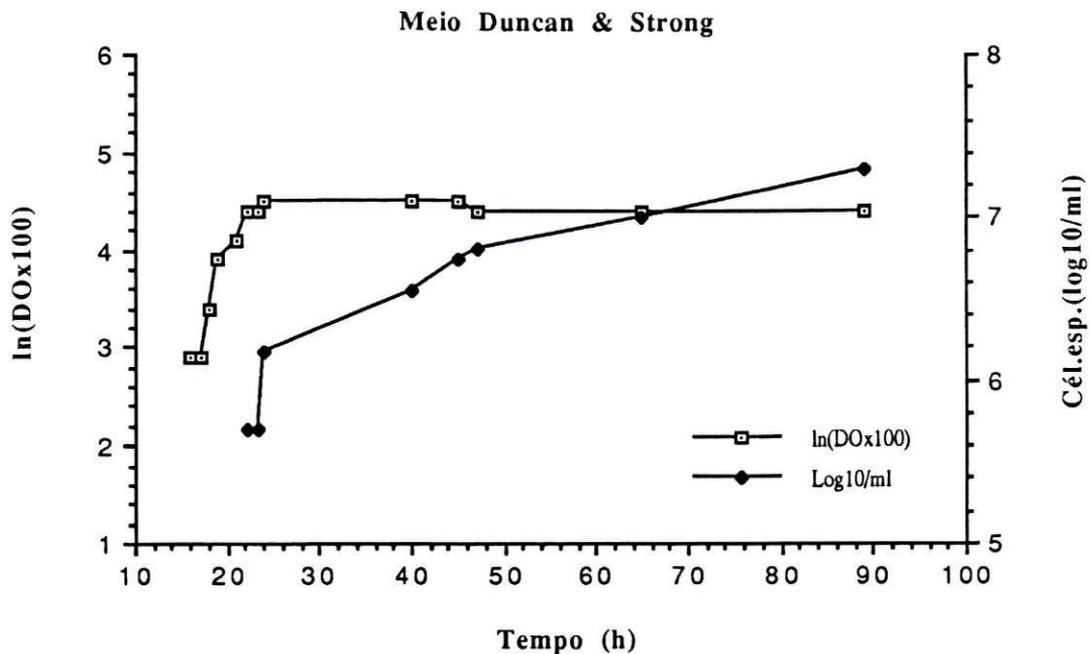


Fig.24. Curva de crescimento e cinética de esporulação de *C. difficile*, estirpe CD1, em meio de Duncan & Strong.

7.3. Influência do meio de esporulação no processo esporulativo

Quando comparamos a cinética de esporulação nos dois meios usados (Fig.25) verificamos que o processo esporulativo se inicia mais cedo no meio de Wilson (cerca de 2 h antes). Este parece constituir um meio mais eficaz para o crescimento de *C. difficile*, como o revelam as curvas de crescimento bacteriano (Figs 23, 24), as quais registam, para o meio de Wilson, valores mais elevados de transmitância comparativamente ao meio de Duncan & Strong, significando a presença de uma maior quantidade de massa celular.

Embora o número máximo de células esporuladas, atingido nos dois meios, seja praticamente idêntico em termos absolutos, entre 2×10^7 /ml ($7.3 \log_{10}$) e 2.4×10^7 /ml (7.4

log₁₀), este valor é praticamente atingido no meio de Wilson 21 h após o início do processo de esporulação mas só ao fim de aproximadamente 70 h no meio de Duncan & Strong. Também a evolução da população de células esporuladas se mostra diferente nestes dois meios. Enquanto que no meio de Wilson assistimos a ligeiras flutuações no número de células em esporulação, mas este número não se altera significativamente em termos absolutos, $0.6 \times 10^7/\text{ml}$ ($6.8 \log_{10}$) versus $2.4 \times 10^7/\text{ml}$ ($7.4 \log_{10}$), no meio de Duncan & Strong, a população de células esporuladas vai aumentando progressivamente, desde o início do processo de esporulação, desde valores de $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ ($5.7 \log_{10}$) até $2 \times 10^7/\text{ml}$ ($7.3 \log_{10}$).

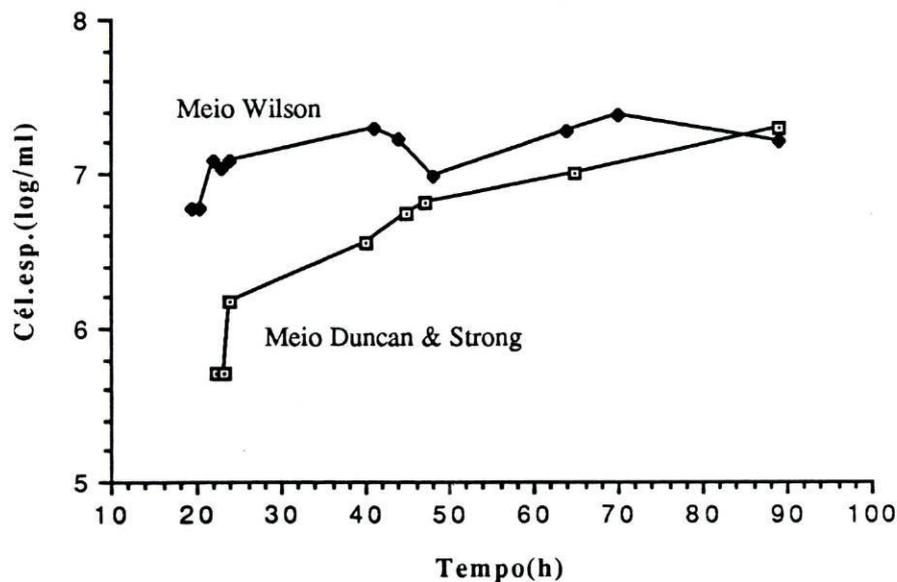


Fig.25. Cinética de esporulação de *C. difficile*, estirpe CD1: meio de Wilson versus meio de Duncan & Strong.

8. Caracterização ultraestrutural do processo esporulativo

Células provenientes dos meios de esporulação de Wilson e Duncan & Strong, previamente enriquecidos em formas esporulativas (ver Material e Métodos), foram recolhidas a partir do final da fase exponencial de crescimento, tempo que correspondeu ao início do processo de esporulação (ver 7.1 e 7.2), tendo a recolha das amostras sido prolongada pelos 5 dias seguintes. Procedeu-se depois à caracterização ultraestrutural das células em esporulação. Em todas as amostras foi observada a co-existência de células em diferentes fases da esporulação.

8.1. Fase I

O alongamento do material nuclear, no sentido do eixo maior da célula, não foi visualizado em nenhuma das amostras observadas

8.2. Fase II

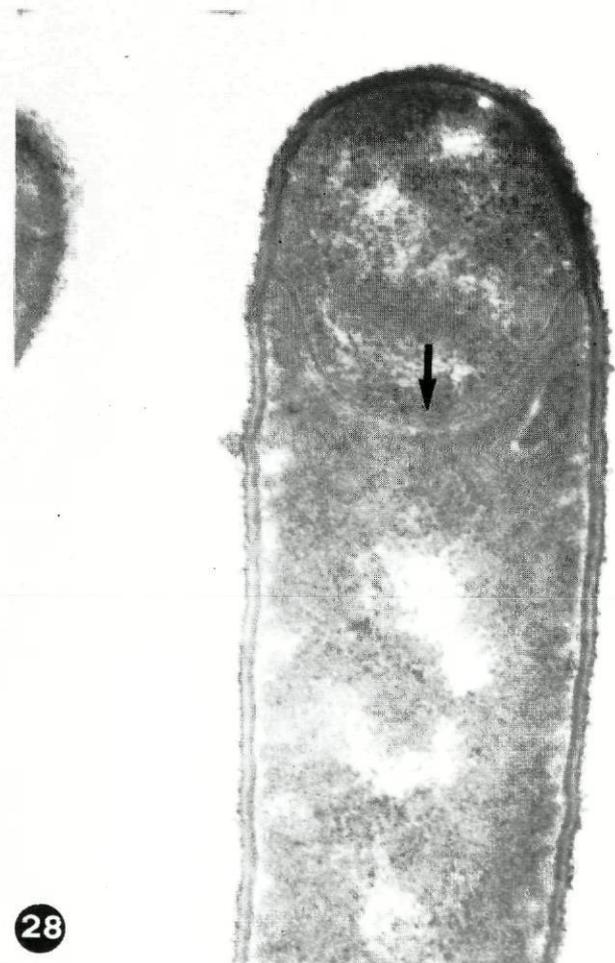
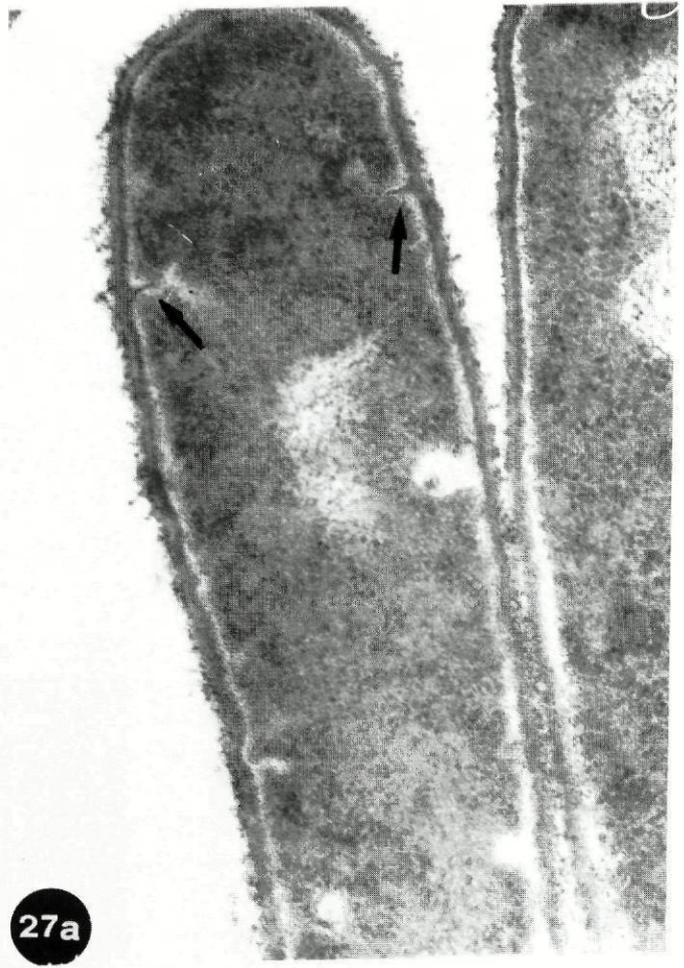
A fase II caracteriza-se pela formação do septo esporulativo, estrutura que constitui a primeira indicação morfológica definitiva do processo de esporulação. Ao contrário do septo de divisão celular, que apresenta uma localização equatorial (Fig. 1), o septo esporulativo surge com uma posição polar (Fig.26).

Inicialmente começa a visualizar-se, num dos pólos da bactéria, a formação de duas protuberâncias parietais, dispostas simetricamente (Fig.27a), as quais deslocando-se no sentido do citoplasma são acompanhadas da invaginação simultânea da membrana citoplasmática (Fig.27b). Depois de formado, o septo esporulativo apresenta-se constituído por um material bastante electronodenso, com uma aparência semelhante ao da camada interna da parede celular, dispendo-se entre duas membranas cujo perfil trilaminar é difícil de visualizar (Fig.26). A S-layer parece não participar na formação do septo esporulativo tal

Fig.26. Célula de *C. difficile*, estirpe CD1, proveniente de meio de Wilson (22 h), na fase II: formação do septo esporulativo. De notar a localização polar do septo de esporulação e a presença de material parietal electronodenso entre os folhetos das duas membranas do septo (seta). É bem visível o material nuclear do pré-esporo. Fixação GAFACA/OsO₄. Ampliação 62.000 x.

Fig.27. Célula de *C. difficile*, estirpe CD1, proveniente de meio de Wilson (22 h), no início da fase II. Em (a) começam a ser visíveis duas protuberâncias parietais simétricas com localização polar (setas). Em (b) a penetração do material parietal, no sentido do citoplasma, é já bem evidente acompanhando-se da invaginação simultânea da membrana citoplasmática (setas). Fixação OsO₄/GAFACA. Ampliação: (a) 78.000 x; (b) 78.000 x.

Fig.28. Como na Fig.30. O septo esporulativo apresenta uma elongação no sentido do pólo não esporal da célula (seta) provocando o aumento de volume do futuro pré-esporo. Ampliação 62.000 x.



como se verificou com o septo de divisão celular. O septo esporulativo sofre posteriormente uma elongação no sentido do pólo não esporal da célula, provocando um aumento de volume do futuro pré-esporo (Fig.28). Nesta fase da esporulação é bem visível o material nuclear do pré-esporo (Fig.26).

8.3. Fase III

A individualização do pré-esporo no citoplasma da célula mãe (esporângio) caracteriza a fase III (Fig.29). Limitando o pré-esporo vamos encontrar duas membranas, a interna e a externa, que obrigatoriamente apresentam, devido à sua origem, polaridades opostas com os folhetos mais densos virados para o interior. Na célula da fase III, representada na Fig.30., o perfil assimétrico das membranas do pré-esporo não é muito evidente, devido à má preservação dos folhetos. Notar o aparecimento, no espaço intermembranar, de um material mais electronodenso correspondente à futura parede esporal.

8.4. Fase IV

Esta fase é caracterizada pela formação da parede esporal e pelo aparecimento da túnica interna e da zona cortical (Bayen *et al*, 1967; Rousseau *et al*, 1971 a, b).

Na Fig.31 a parede esporal, que aparece sob a forma de uma camada homogénea com grande densidade aos electrões, é agora bem evidente, começando também a visualizar-se, à volta do pré-esporo, as primeiras lamelas da túnica interna. A zona cortical começa a definir-se junto da parede esporal, caracterizando-se por uma diminuição na densidade aos electrões, ao mesmo tempo que o número de lamelas da túnica interna vai aumentando (Fig.32). Nesta fase os ribossomas são ainda bem evidentes, mas o material nuclear deixou de se visualizar.

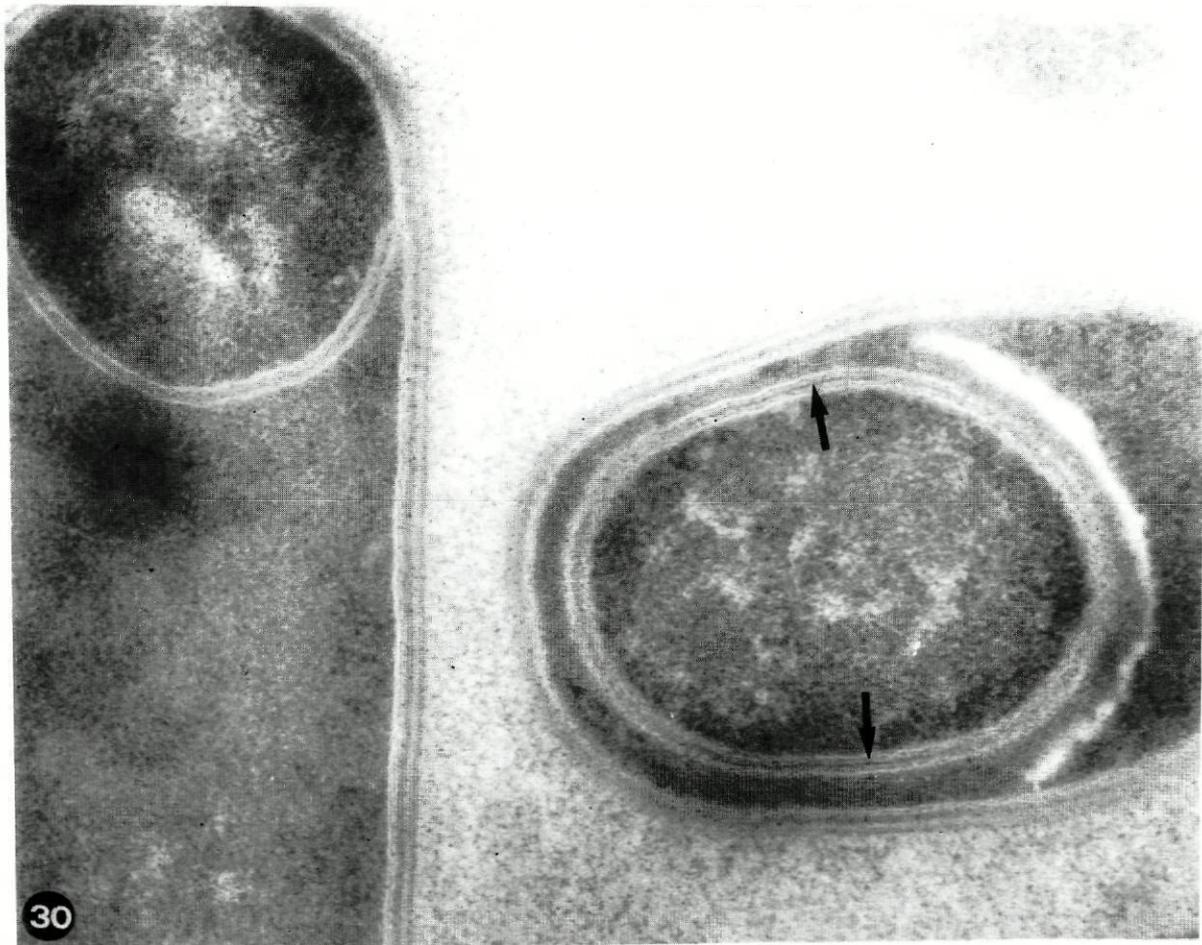
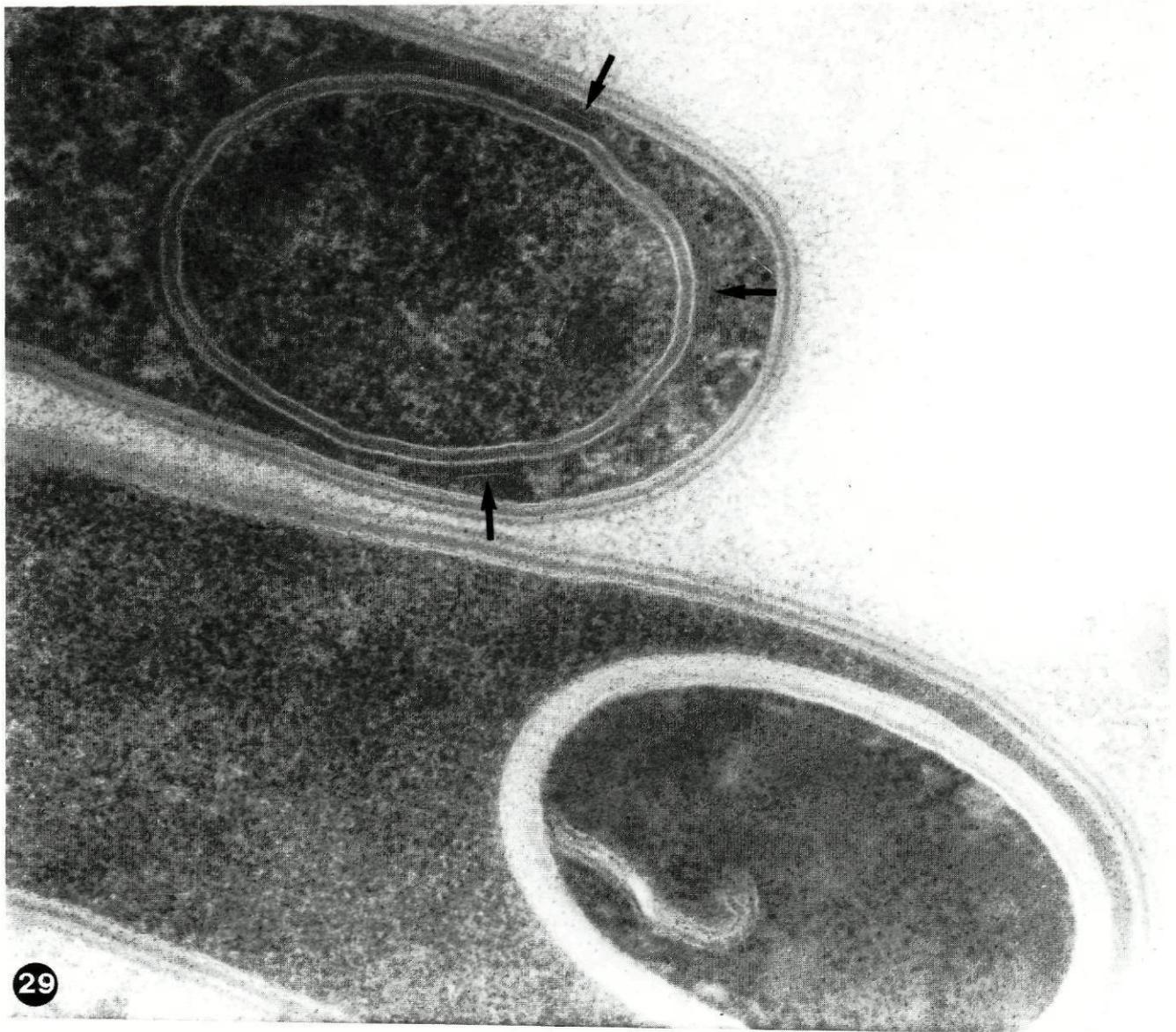
Fig.29. Célula de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, proveniente de meio de Wilson (30 h), na fase III: individualização do pré-esporo no citoplasma do esporângio. Uma linha electronodensa, contornada por uma zona clara virada para o exterior, é visível em certas zonas do citoplasma (setas). Abaixo desta encontra-se uma célula em fase mais avançada de esporulação. Fixação GAFACA/OsO₄. Ampliação 92.000 x.

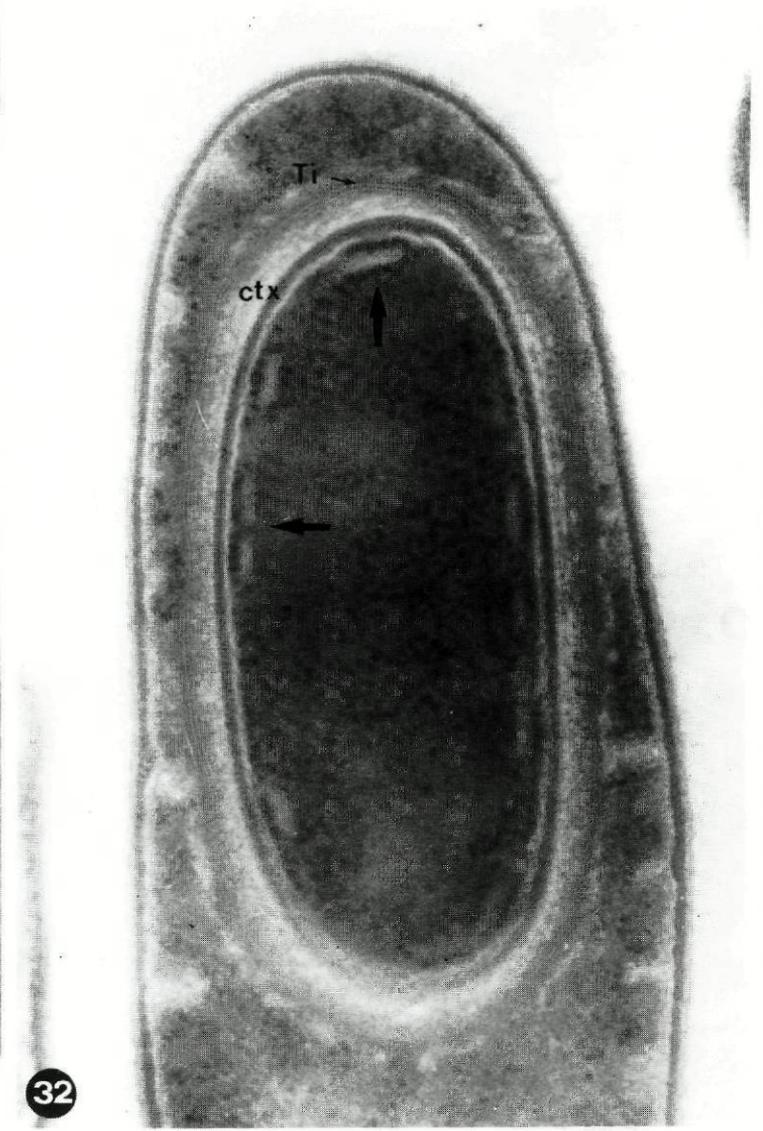
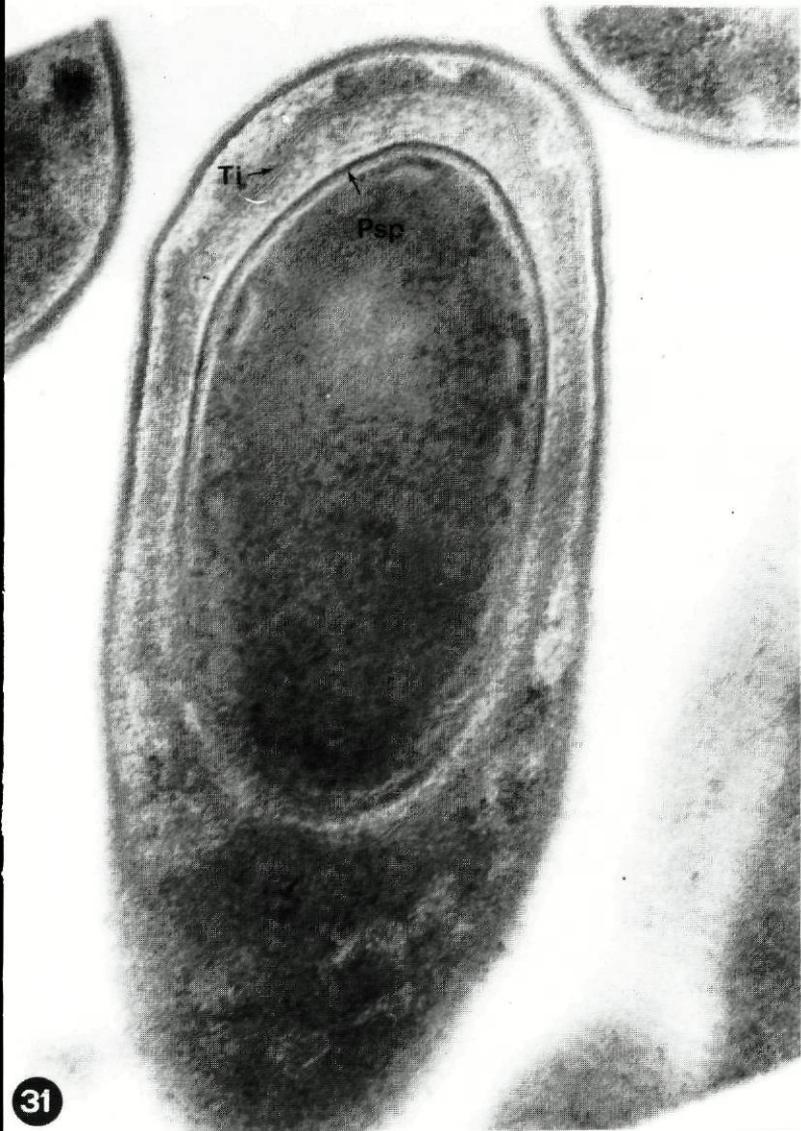
Fig.30. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, proveniente de meio de Wilson (30h). São visíveis duas células na fase II e III, respectivamente. Na célula na fase III, notar o aparecimento de uma camada mais electronodensa (setas), correspondente à futura parede esporal, entre as duas membranas do pré-esporo e na estrutura lamelar lateral. Ampliação 85.000 x.

Fig.31. Célula de *C. difficile*, estirpe CD1, proveniente de meio de Wilson (60 h), na fase IV. A formação da parede esporal (Psp) coincide com o aparecimento das primeiras lamelas da túnica interna (Ti). Fixação com OsO₄/GAFACA. Ampliação 91.000 x.

Fig.32. Como na Fig.35. A zona cortical (ctx), sem densidade electrónica, começa a definir-se junto da parede esporal, enquanto o número de lamelas da túnica interna (Ti) vai aumentando. Na periferia do citoplasma esporal são visíveis pequenas estruturas em arco menos electronodensas (setas). Ampliação 95.000 x.

Fig.33. Célula de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, proveniente de meio de Wilson (60 h), na fase V. O córtex (ctx) começa a adquirir a sua espessura definitiva e a túnica externa (Te) torna-se visível. Fixação GAFACA/OsO₄. Ampliação 126.000 x.





8.5. Fase V

A fase V é marcada pela maturação do córtex e aparecimento da túnica externa (Bayen *et al.*, 1967). O córtex adquire a sua espessura definitiva, diminuindo a sua densidade aos electrões comparativamente à fase anterior, ao mesmo tempo que a túnica externa aparece (Fig.33). Nesta fase são visíveis ainda os ribossomas no citoplasma esporal assim como também porções de material citoplasmático localizado entre o córtex e a túnica interna (Fig.34).

8.6. Fase VI

Na fase VI o esporo, ainda dentro do esporângio, apresenta já a sua estrutura definitiva (Fig.35). O córtex sem densidade electrónica contrasta com a túnica externa electronodensa de aspecto crenado. A estrutura multilamelar da túnica interna é bem visível entre estas duas estruturas. O amadurecimento de todos estes invólucros esporais, característica desta fase, vai dificultar o acesso dos fixadores levando conseqüentemente a uma deficiente preservação do citoplasma esporal. Este que começou por apresentar, na fase III (Fig.29), um aspecto granular comparável à do citoplasma esporangial foi, à medida que se foram formando os invólucros esporais, tornando-se cada vez mais difuso e menos contrastado, atingindo o seu aspecto definitivo aqui na fase VI. A perda da visualização da estrutura do citoplasma esporal, bem visível nas Figs 35a, 35b, tem servido como marcador morfológico do final desta fase. O citoplasma esporal apresentará na fase seguinte um aspecto difuso e pouco contrastado (Fig.36).

8.7. Fase VII

A lise do esporângio e a libertação do esporo maduro caracterizam esta última fase. Na Fig.37 é visível a lise do esporângio. No esporo livre (Fig.38) é visualizável o córtex, a

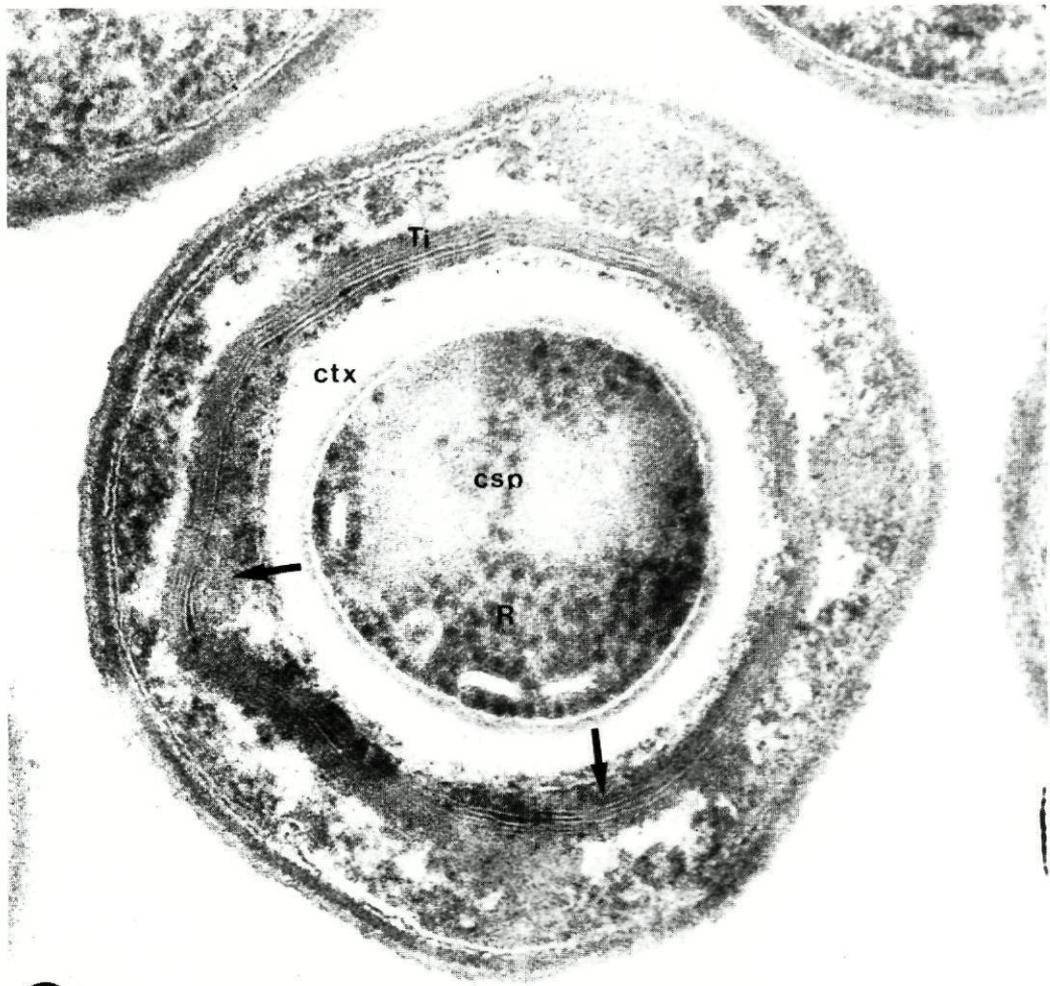
Fig.34. Como na Fig.37. Célula em fase V. Notar o aspecto homogéneo do cortéx (ctx) e a sua ausência de densidade electrónica. As lamelas da túnica interna (5-8) são já bem visíveis (Ti). Porções de material citoplasmático podem ser visualizadas entre o cortéx e a túnica interna (seta). Os ribossomas (R) são ainda evidentes no citoplasma esporal (csp) mas o material nuclear deixou de se visualizar. Ampliação 131.000 x.

Fig.35. Célula de *C. difficile*, estirpe CD1, proveniente de meio Duncan & Strong (3 dias), na fase VI. O esporo, ainda dentro do esporângio, apresenta já a sua estrutura definitiva. Notar a baixa densidade do cortéx (ctx) em (a) e a estrutura crenada da túnica externa (Te) em (b). É bem visível a perda gradual da estrutura granulosa do citoplasma esporal (csp). Fixação com GAFACA/OsO₄. Ampliação: (a) 78.000 x; (b) 96.000 x.

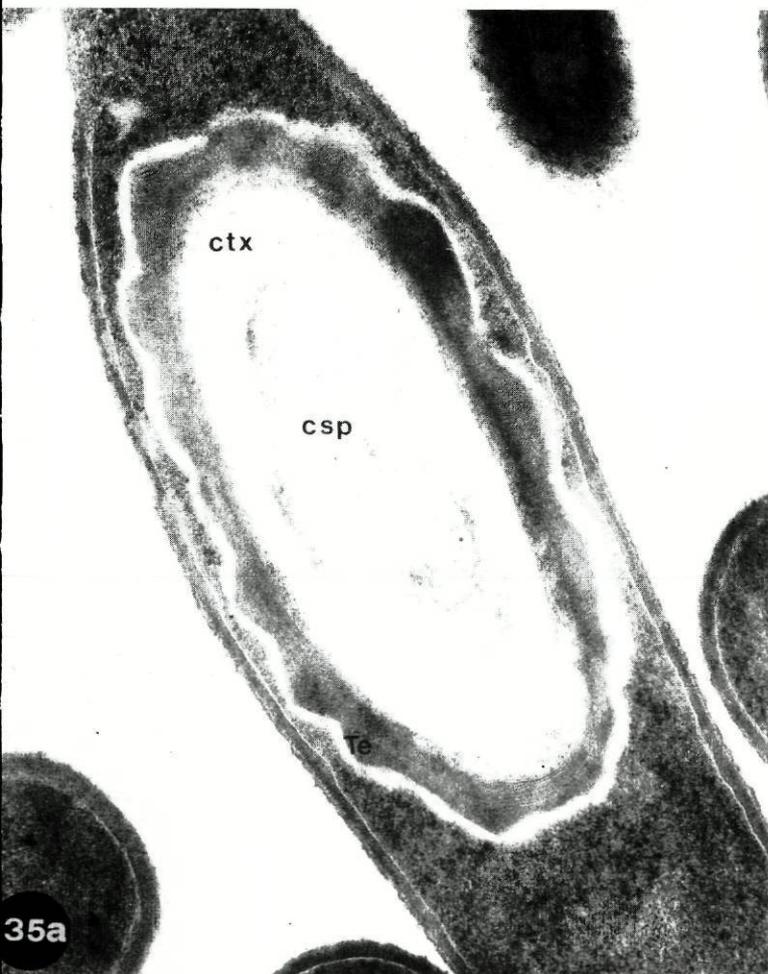
Fig.36. Célula de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, proveniente de em meio Duncan & Strong (5 dias), na fase VII. Neste esporo maduro é bem evidente o aspecto difuso e pouco contrastado do citoplasma esporal (csp). Cortéx (ctx); túnica interna (Ti); túnica externa (Te). Fixação GAFACA/OsO₄. Ampliação 100.000 x.

Fig.37. Célula de *C. difficile*, estirpe CD1, proveniente de meio Duncan & Strong (5 dias), na fase VII. É visível a lise do esporângio (setas). Fixação com OsO₄/GAFACA. Ampliação 96.000 x.

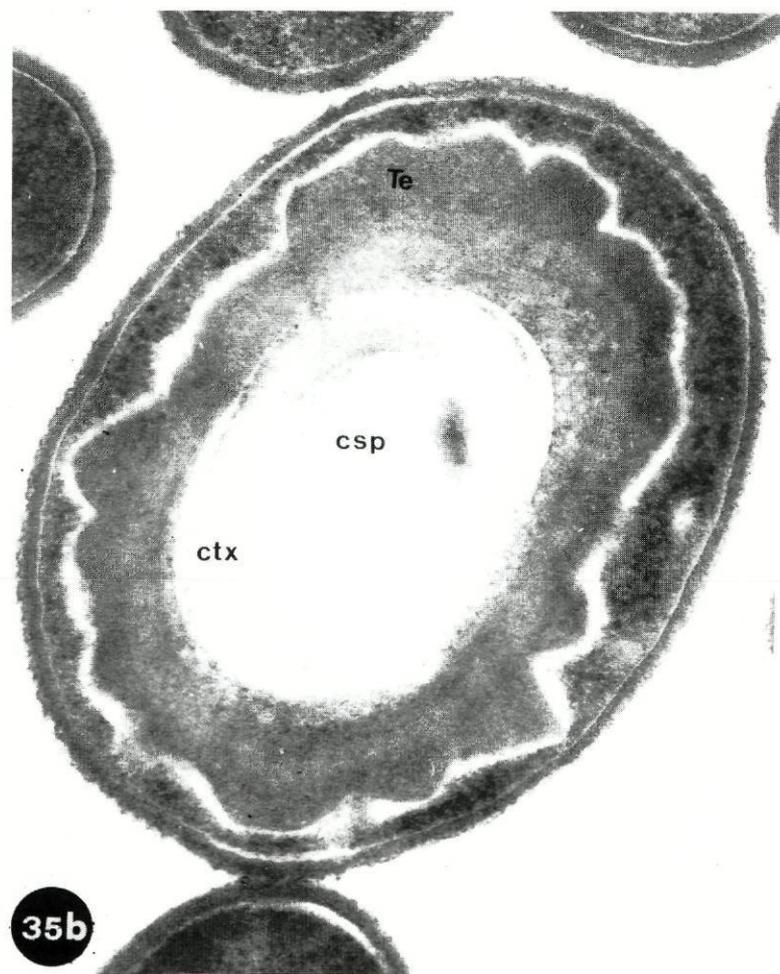
Fig.38. Esporo livre, obtido de uma cultura de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, em meio de Wilson, com 5 dias. São bem visíveis as seguintes estruturas do esporo: citoplasma esporal (csp); cortéx (ctx); túnica interna (Ti); túnica externa (Te); exospório (Ex). Fixação GAFACA/OsO₄. Ampliação 114.000 x.



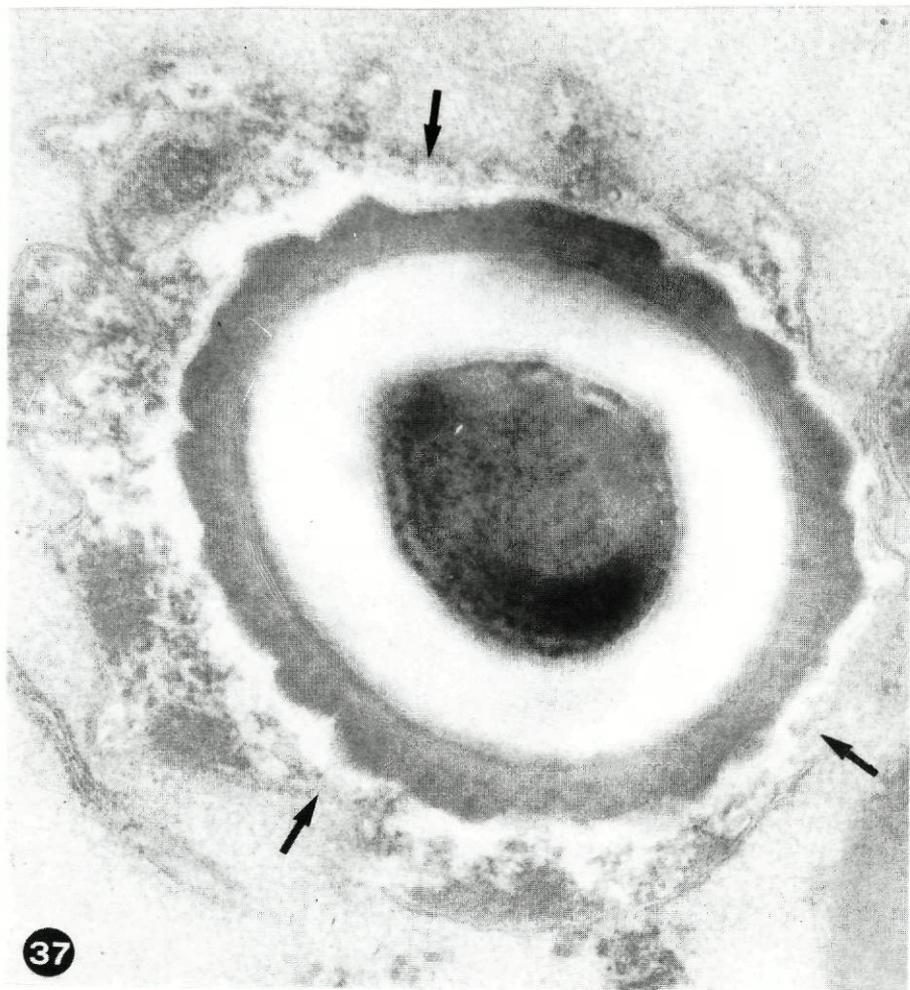
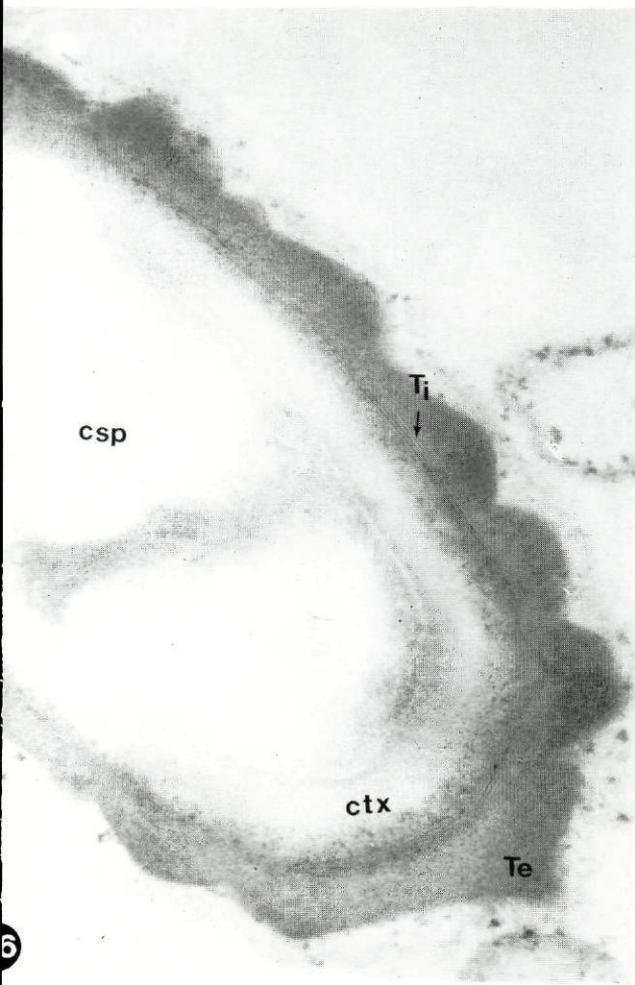
34



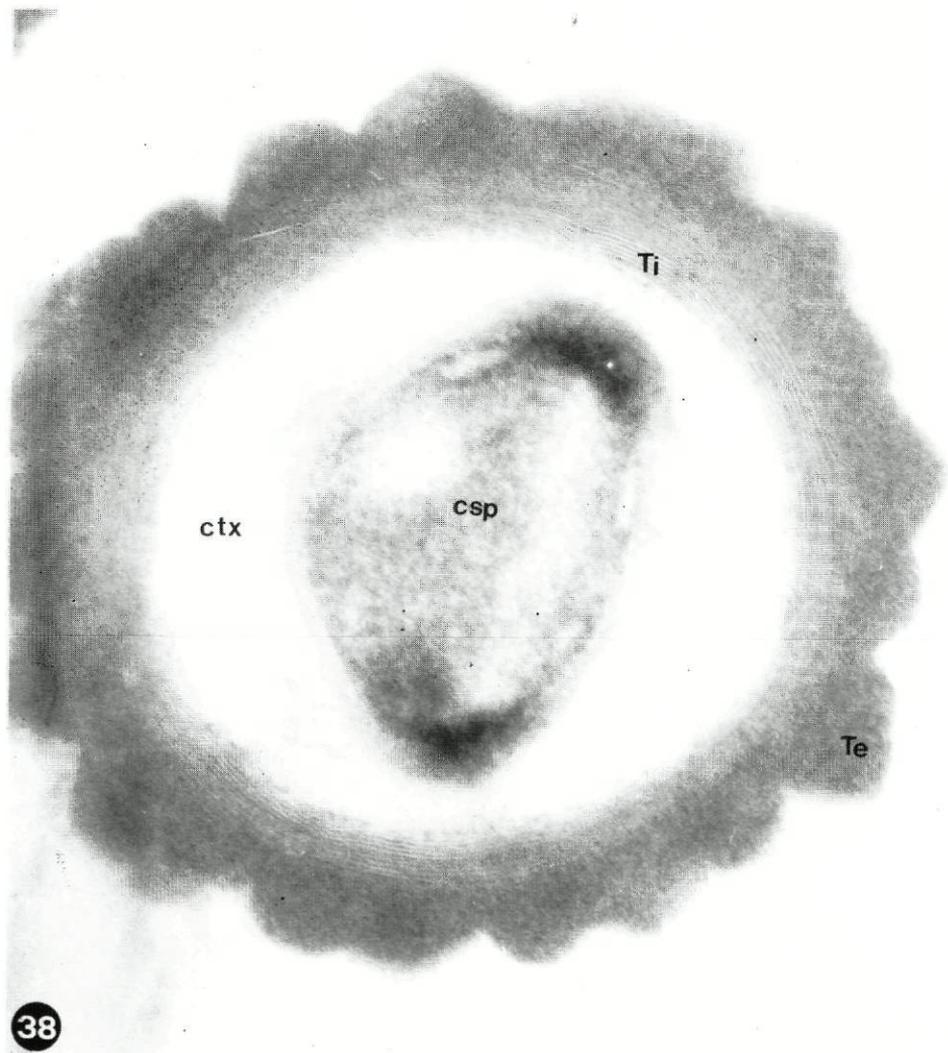
35a



35b



37



38

túnica interna de estrutura lamelar constituída por 5-8 lamelas e a túnica externa, muito electronodensa, de estrutura crenada.

8.8. Exospório

O exospório começou a visualizar-se no citoplasma da célula mãe, sob a forma de linha electronodensa contornada por uma zona clara virada para o exterior, no início da fase IV (Fig.29). A sua visualização tornou-se depois difícil nas fases seguintes, tendo sido apenas detectado muito raramente (Figs 39, 40). Só após libertação do esporo maduro a sua presença se tornou evidente(Fig.41).

8.9. Ultraestrutura de esporos livres tratados pela ureia-mercaptoetanol

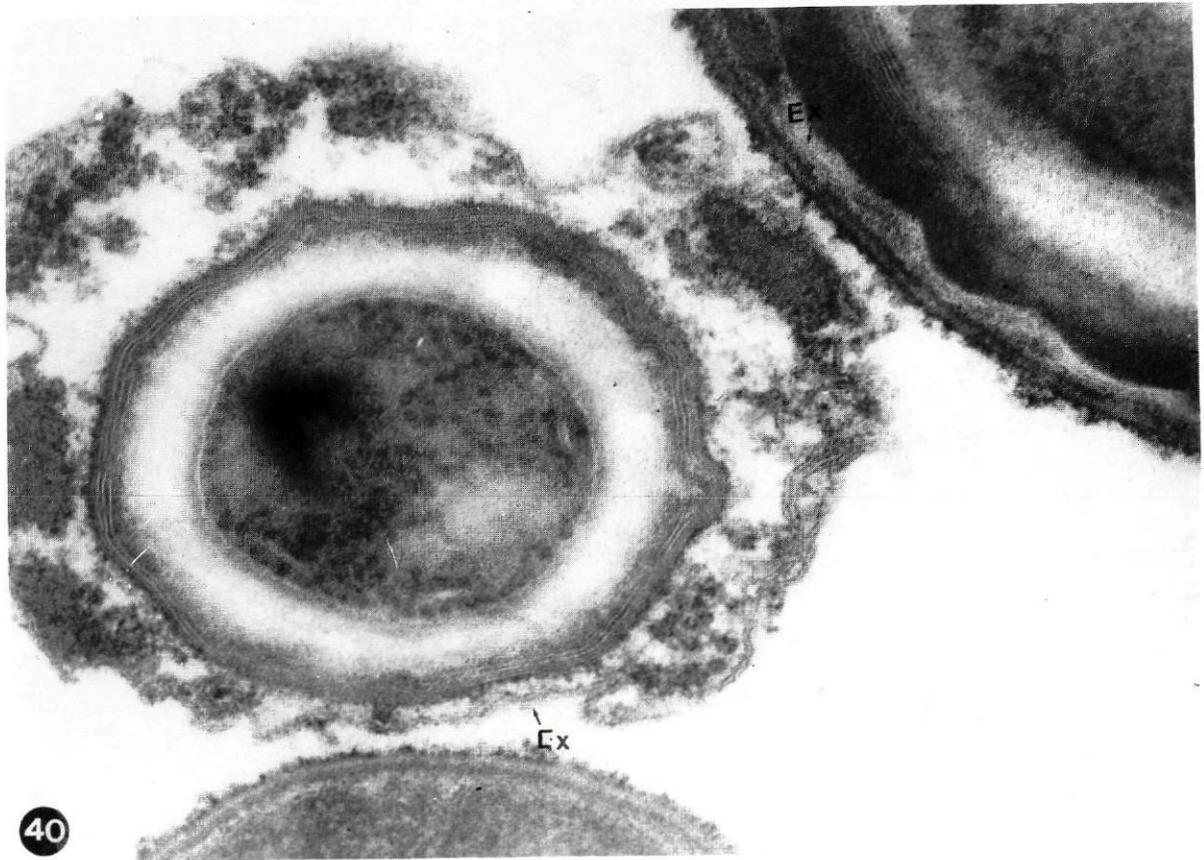
A estrutura mais afectada por este tratamento parece ser a túnica externa, a qual deixou de ser visualizável, mas é de notar também uma certa desorganização a nível das lamelas da túnica interna (Fig.42).

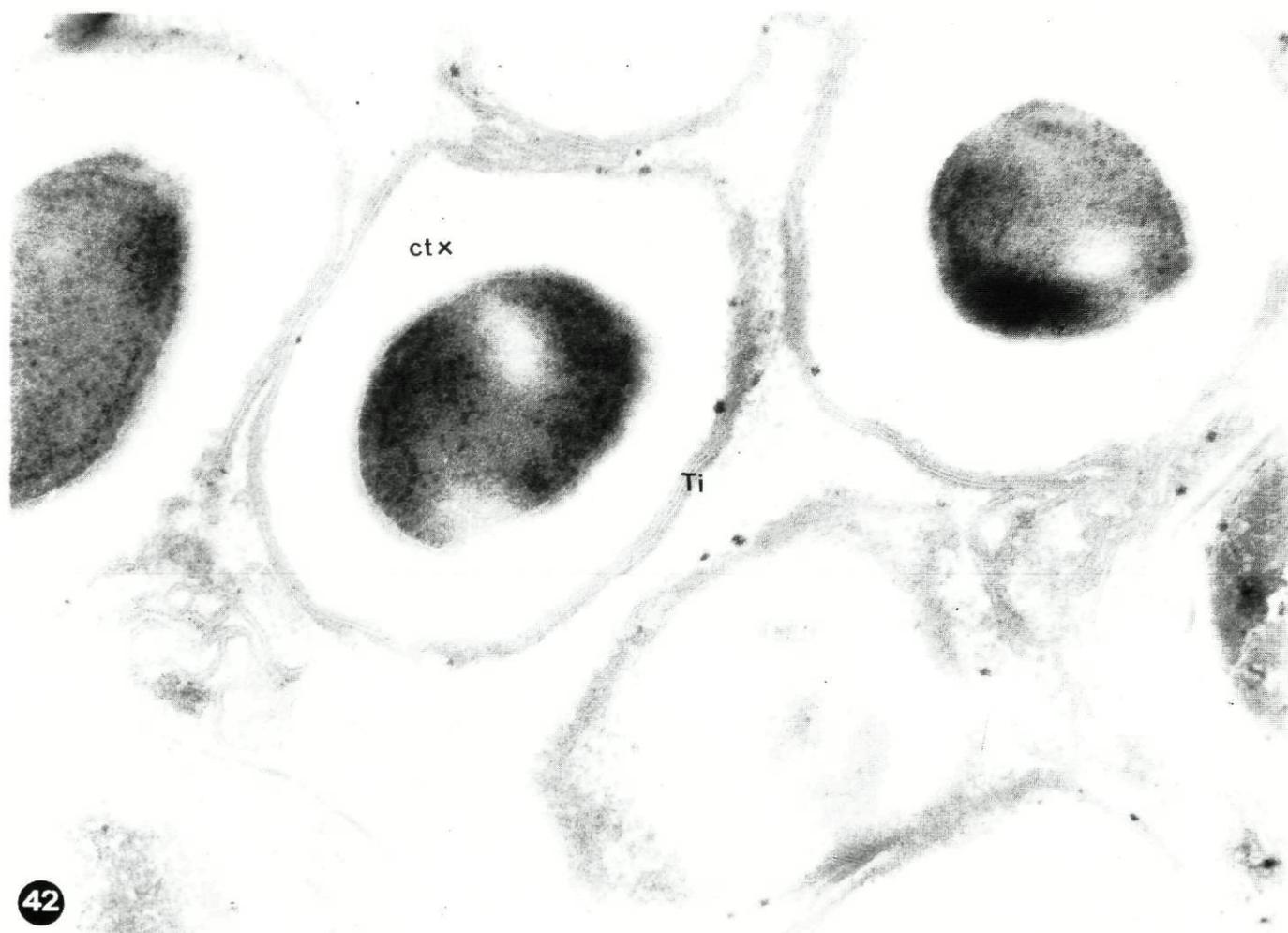
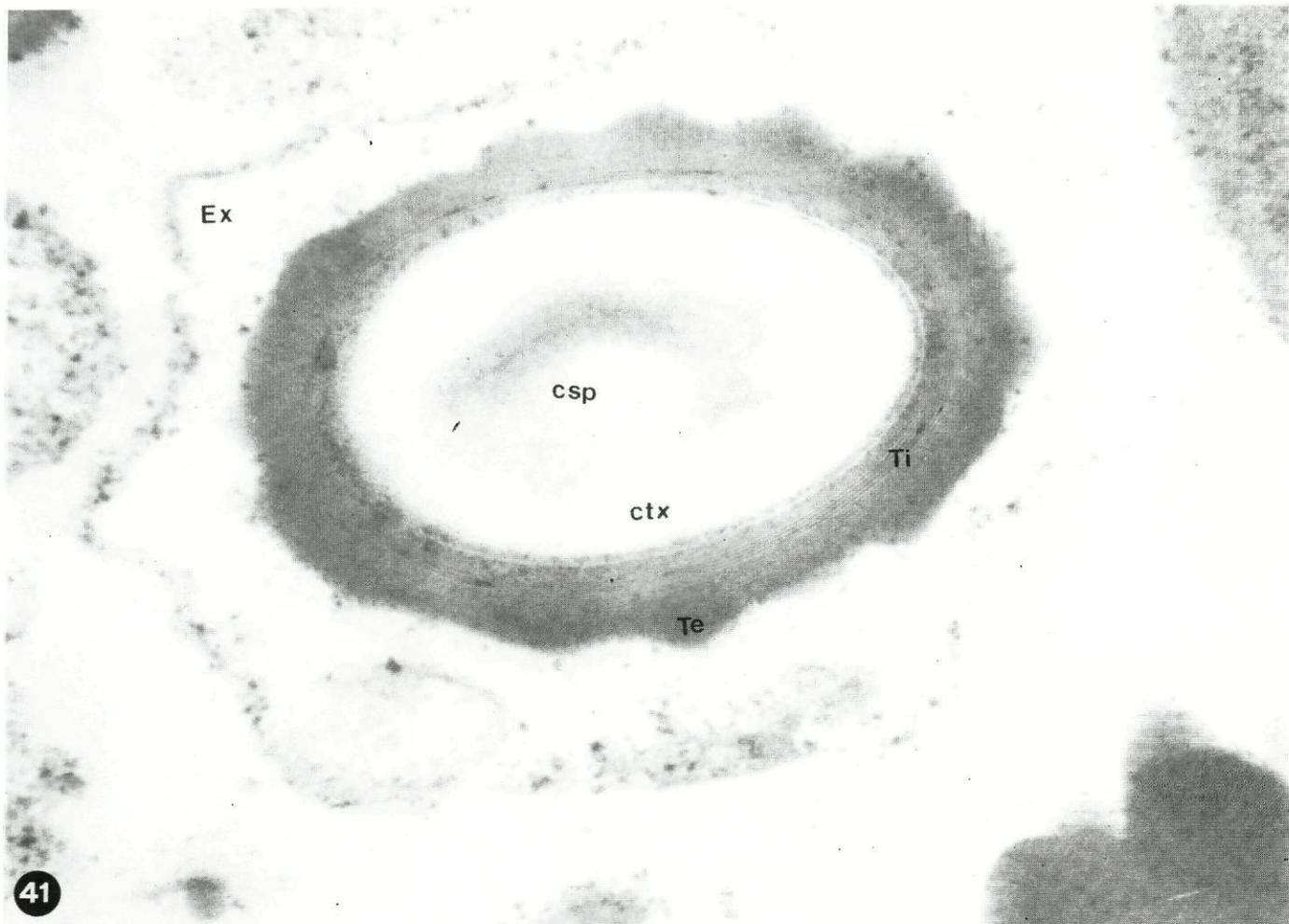
Fig.39. Células de *C. difficile*, estirpe CD1, provenientes de uma cultura com 5 dias em meio de Wilson. São visíveis células em fase V, VI e VII. Na célula em fase VI é visível o exospório (Ex). Fixação GAFACA/OsO₄. Ampliação 82.000 x.

Fig.40. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura com 5 dias em meio de Wilson. São visíveis células em fase VI e VII. Na célula em fase VI é visível o exospório (Ex). Fixação OsO₄/GAFACA. Ampliação 132.000 x.

Fig.41. Esporo livre de *C. difficile*, estirpe CD1, obtido de uma cultura com 5 dias em meio de Wilson. São bem visíveis as seguintes estruturas do esporo: citoplasma esporal (csp); parede esporal (psp); cortéx (ctx); túnica interna (Ti); túnica externa (Te); exospório (Ex). Fixação OsO₄/GAFACA. Ampliação 112.000 x.

Fig.42. Esporo livre de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, obtido de uma cultura com 5 dias em meio de Wilson após tratamento pela ureia-mercaptoetanol. Notar o desaparecimento da túnica externa e a desorganização das lamelas da túnica interna (Ti) sobrepostas ao cortéx (ctx). Fixação OsO₄/GAFACA. Ampliação 97.000 x.





**Vancomicina e metronidazol: efeito na morfologia, na
ultraestrutura e no crescimento de *C. difficile***

Parte II

1. Alterações morfológicas e fisiológicas induzidas por concentrações sub-inibitórias de vancomicina e metronidazol

Os resultados apresentados foram obtidos com as estirpes ATCC 9689, CD1, CD22 e CD89.

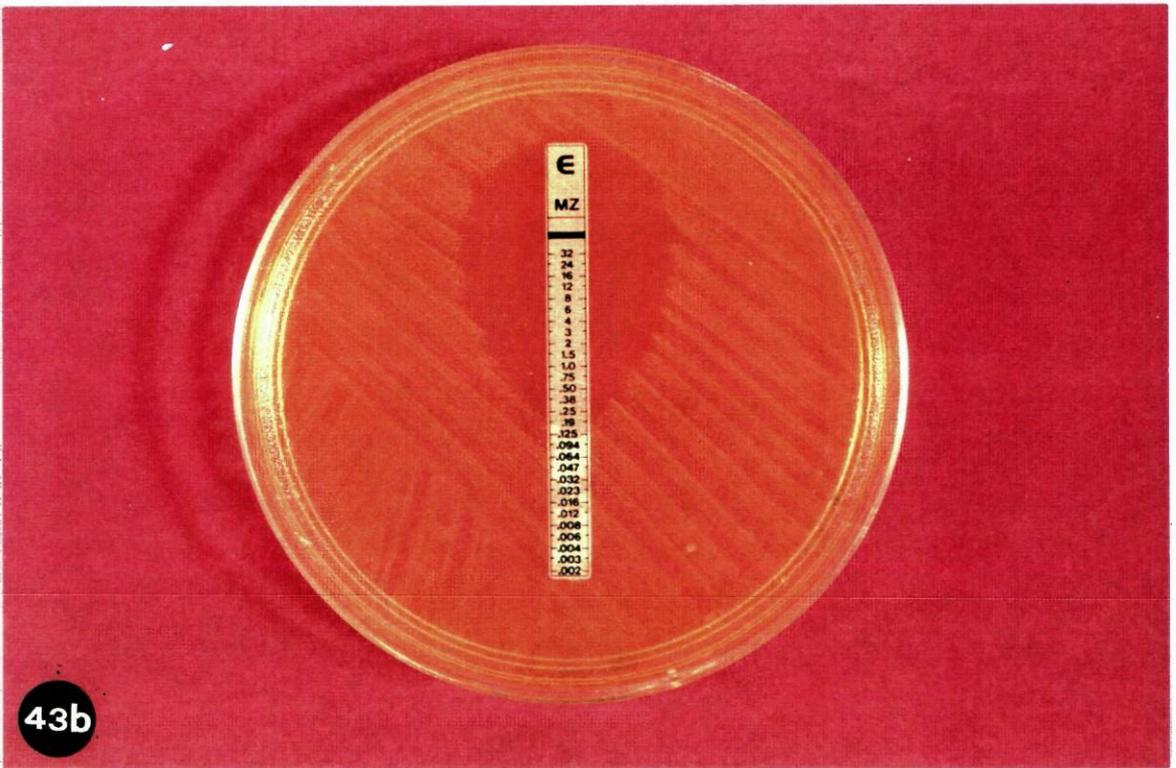
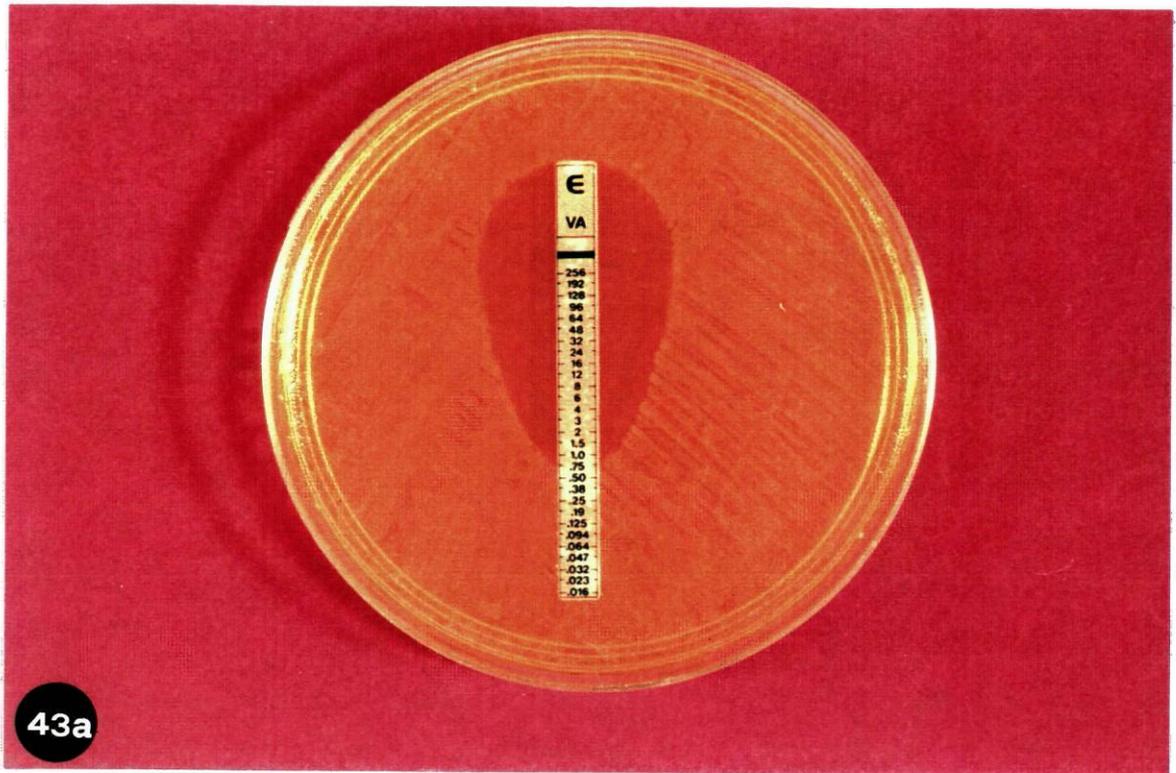
1.1. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM)

Os valores de CIM de vancomicina e metronidazol contra as estirpes ensaiadas de *C.difficile* foram determinados pelo E test (Fig.43) e estão indicados no Quadro II. Estes variaram desde 0.5-0.75mg/L para a vancomicina e 0.125-0.19mg/L para o metronidazol. Com base nestes valores foram calculadas as concentrações sub-inibitórias da vancomicina e do metronidazol usadas nos diversos ensaios.

Quadro II. Valores de CIM, obtidos pelo E test, apresentados pela vancomicina e metronidazol frente às estirpes de *C. difficile* ensaiadas

Designação estirpe	CIM (mg/L)	
	Vancomicina	Metronidazol
ATCC 9689	0.75	0.19
CD1	0.75	0.19
CD22	0.75	0.125
CD89	0.50	0.19

Fig.43. E-teste. Determinação do CIM da vancomicina e do metronidazol, para o *C. difficile* ATCC 9689. O valor de CIM (mg/L) é dado pelo ponto de intersecção entre a zona de inibição de crescimento e a tira do E test. Valores de 0.75mg/L para a vancomicina (VA) e 0.19mg/L para o metronidazol (MZ), podem ser observados, respectivamente em (a) e (b).



1.2. Efeito no crescimento bacteriano

De modo a avaliarmos o efeito destes dois agentes antimicrobianos, quando presentes em concentrações sub-inibitórias, no crescimento de *C. difficile* ATCC 9689, foram realizadas culturas em caldo Schaedler contendo concentrações de 0.375 mg/L de vancomicina ou 0.095 mg/L de metronidazol, correspondentes, respectivamente a metade do CIM destes fármacos. As curvas de crescimento assim obtidas foram comparadas com uma curva controlo obtida nas mesmas condições mas na ausência total destes agentes antimicrobianos.

1.2.1. Efeito da vancomicina

A Fig.44 representa o crescimento da estirpe ATCC 9689 de *C. difficile* na presença da concentração sub-inibitória de vancomicina, correspondente ao CIM/2, obtido respectivamente por contagem de células viáveis (c.f.u./ml) (painel A) e por leitura espectrofotométrica (painel B).

A observação da Fig.44A permite concluir que a presença de vancomicina provoca um atraso no crescimento de *C. difficile*, reduzindo de modo significativo ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) o número de células viáveis comparativamente à cultura controlo. Esta redução começa a ser evidente a partir do início da fase exponencial da cultura controlo, mantendo-se durante as 8h seguintes, ou seja durante todo o decorrer desta fase de crescimento. O estudo espectrofotométrico (Fig.44B) confirma estas observações. Os valores de transmitância da cultura exposta à vancomicina apresentam-se também, a partir das 3h de incubação, significativamente mais baixos ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) que os da cultura controlo, sinónimo da presença de uma menor quantidade de massa celular. Às 24h estes valores apresentam-se já idênticos o que demonstra que a massa celular final é semelhante em ambas as culturas.

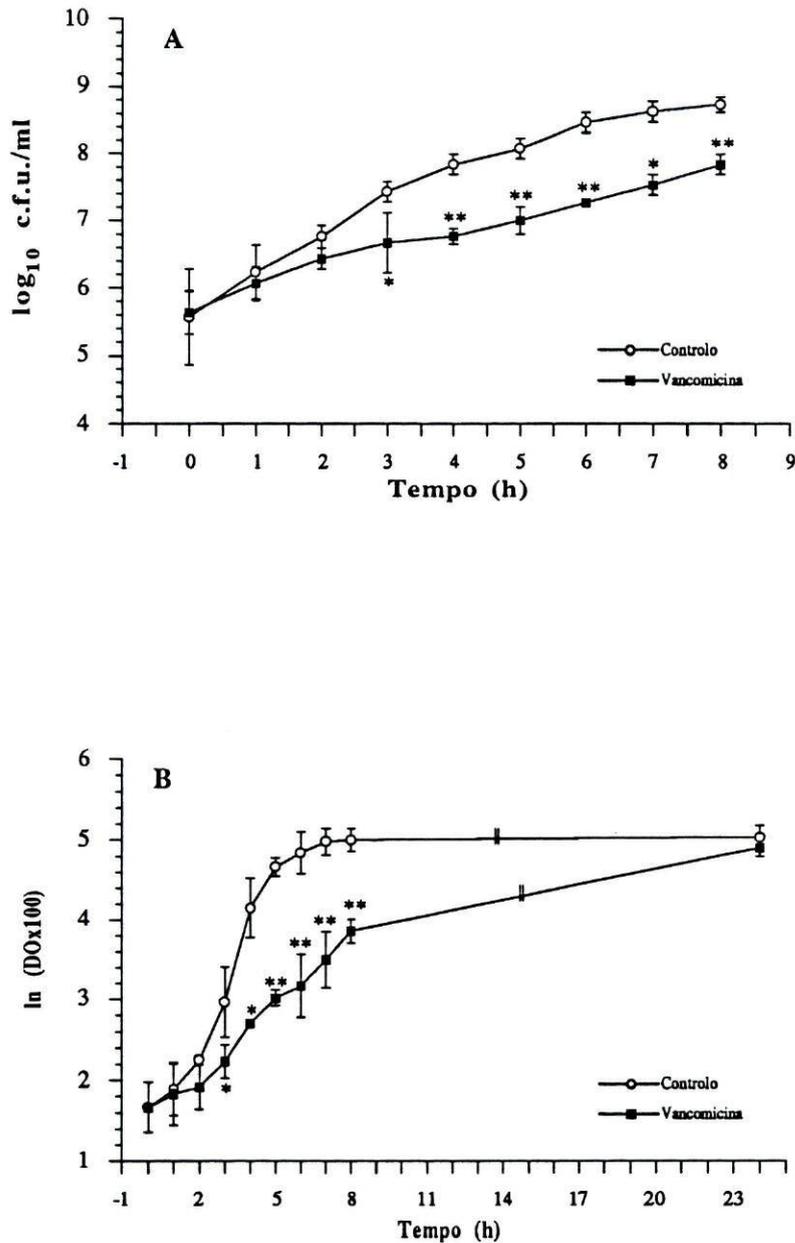


Fig.44. Curvas de crescimento de *C. difficile* ATCC 9689, em caldo Schaedler, na ausência (controlo) e na presença da dose sub-inibitória de vancomicina correspondente ao CIM/2, obtida pela contagem de células viáveis (c.f.u./ml) durante as primeiras 8h (painel A) ou por leitura espectrofotométrica até às 24h (painel B). Os valores representam a média \pm SD de um mínimo de três determinações realizadas em diferentes dias. Diferenças significativas entre os valores médios estão assinaladas com (*) e (**) para $p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente.

1.2.2. Efeito do metronidazol

Na Fig.45 está representado o crescimento de *C. difficile* ATCC 9689, na presença da concentração sub-inibitória de metronidazol, correspondente ao CIM/2, obtido respectivamente por contagem de células viáveis (c.f.u./ml) (painel A) e por leitura espectrofotométrica (painel B).

A observação da Fig.45A mostra que embora a presença do metronidazol provoque, durante a fase de crescimento exponencial, uma ligeira redução no número de células viáveis comparativamente à cultura controle, esta diferença não é no entanto significativa ($p>0.05$). A viabilidade celular no final desta fase é muito semelhante nas duas culturas atingindo ambas a fase estacionária praticamente ao mesmo tempo.

Quando comparamos as curvas de crescimento, obtidas por leitura espectrofotométrica (Fig.45B) verificamos também não ser significativa a diferença entre a cultura controle e a cultura exposta ao agente antimicrobiano ($p>0.05$). A presença da concentração sub-inibitória (CIM/2) de metronidazol não parece ter induzido alterações turbidimétricas importantes apresentando as células um crescimento bastante semelhante ao controle. A massa celular final, às 24h, mostra-se idêntica em ambas as culturas.

1.3. Efeito na morfologia bacteriana (microscopia óptica)

Com a finalidade de despistar o tipo de alterações provocadas pela exposição de *C. difficile* ATCC 9689 a concentrações sub-inibitórias de vancomicina e metronidazol procedemos, quando da determinação do CIM pelo E teste, ao estudo morfológico das bactérias presentes na periferia da "zona de inibição de crescimento", local onde os agentes antimicrobianos estariam em concentrações abaixo do CIM. Verificámos que, comparativamente ao controle (Fig.46), a dose sub-inibitória de vancomicina presente induziu a formação de filamentos curtos, que coraram na sua maioria de Gram negativo (Fig.47a), enquanto que a concentração sub-inibitória de metronidazol foi responsável pelo aparecimento de longos filamentos, que coraram predominantemente de Gram positivo (Fig.47b).

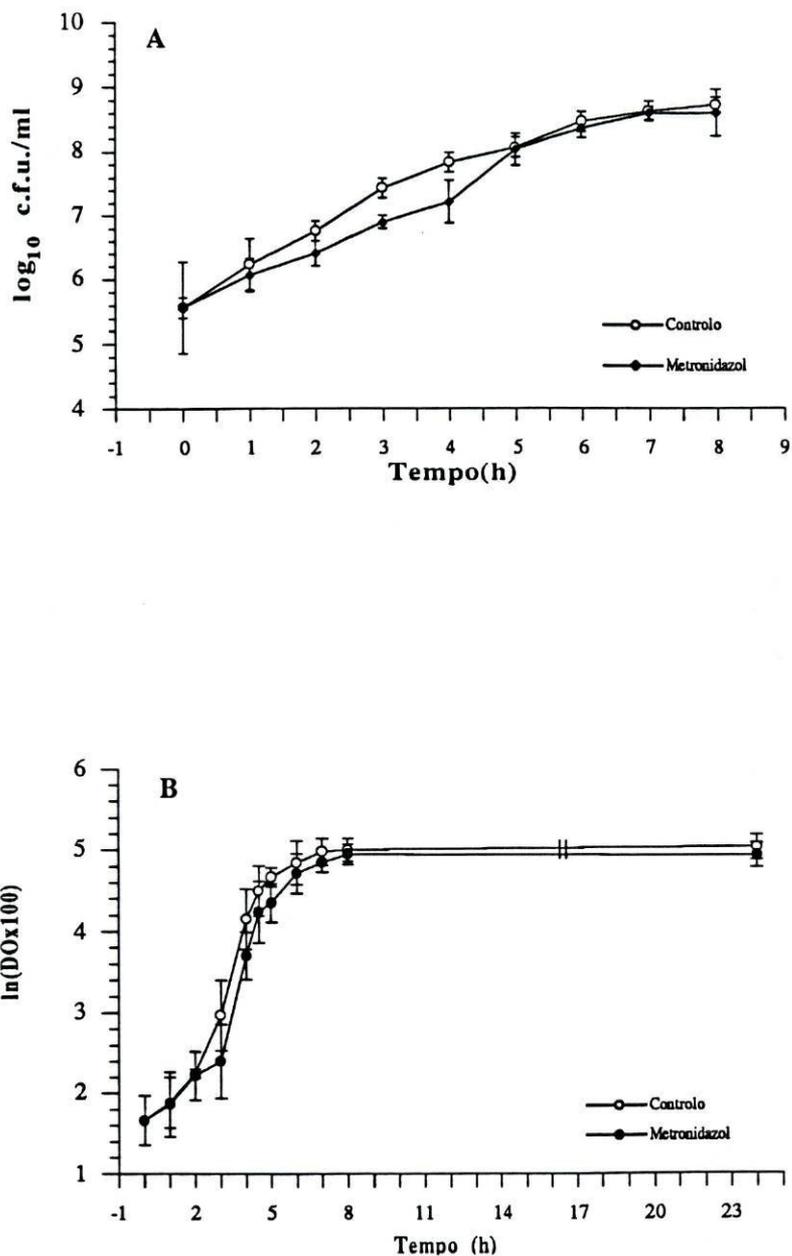
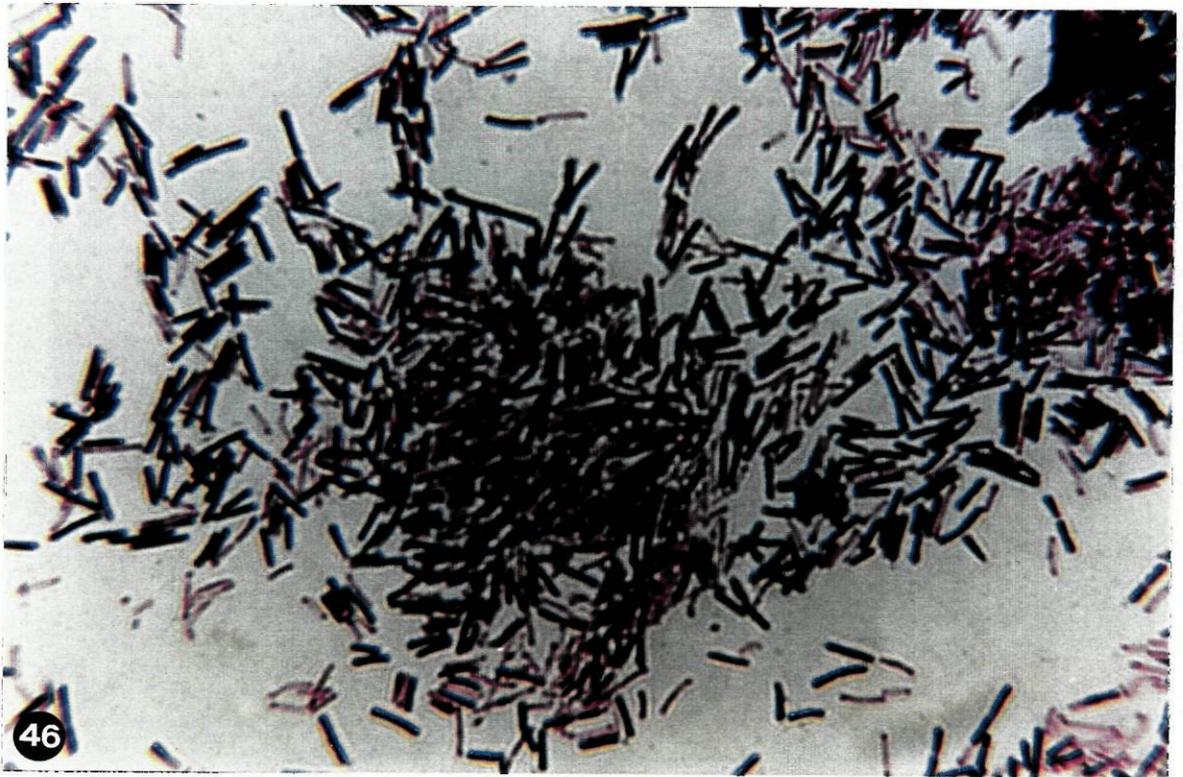


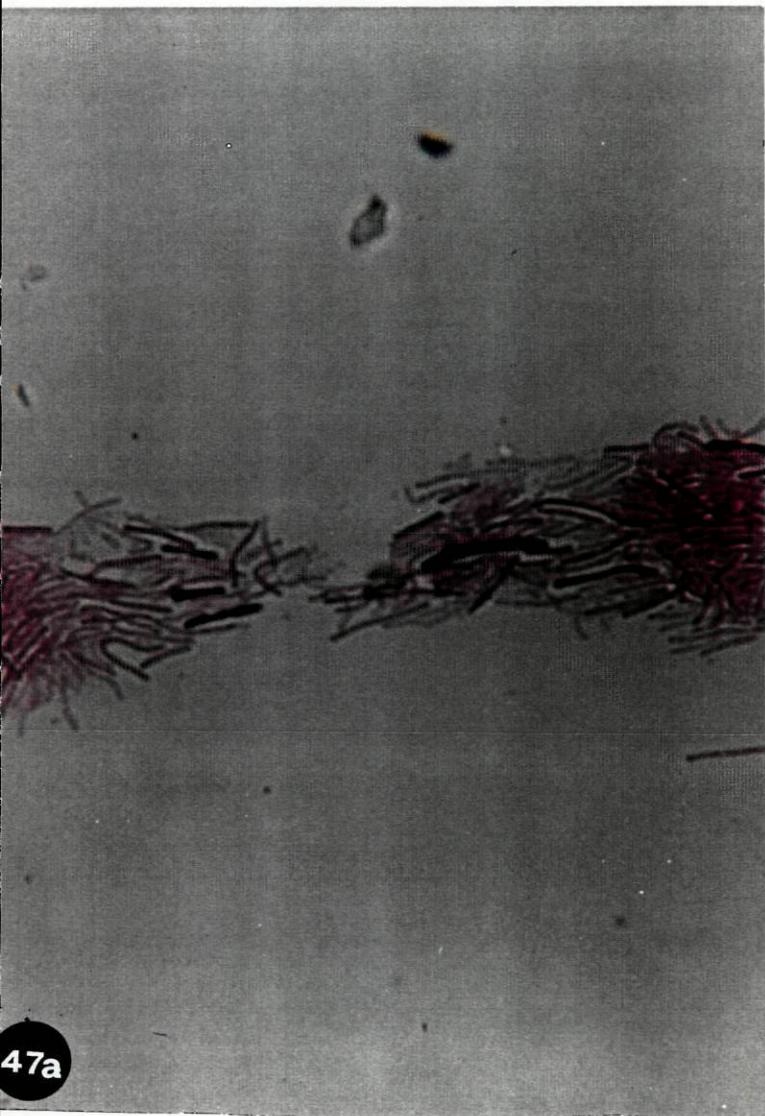
Fig.45. Curva de crescimento de *C. difficile* ATCC 9689, em caldo Schaedler, na ausência (controlo) e na presença de doses sub-inibitórias (CIM/2) de metronidazol, obtida por contagem de células viáveis (c.f.u./ml) durante as primeiras 8h (painel A) e por leitura espectrofotométrica até às 24h (painel B). Os valores representam a média \pm SD de um mínimo de três determinações realizadas em diferentes dias.

Fig.46. *C. difficile* ATCC 9689, com 24 h de crescimento em Schaedler Agar, após coloração de Gram. Ampliação 400x.

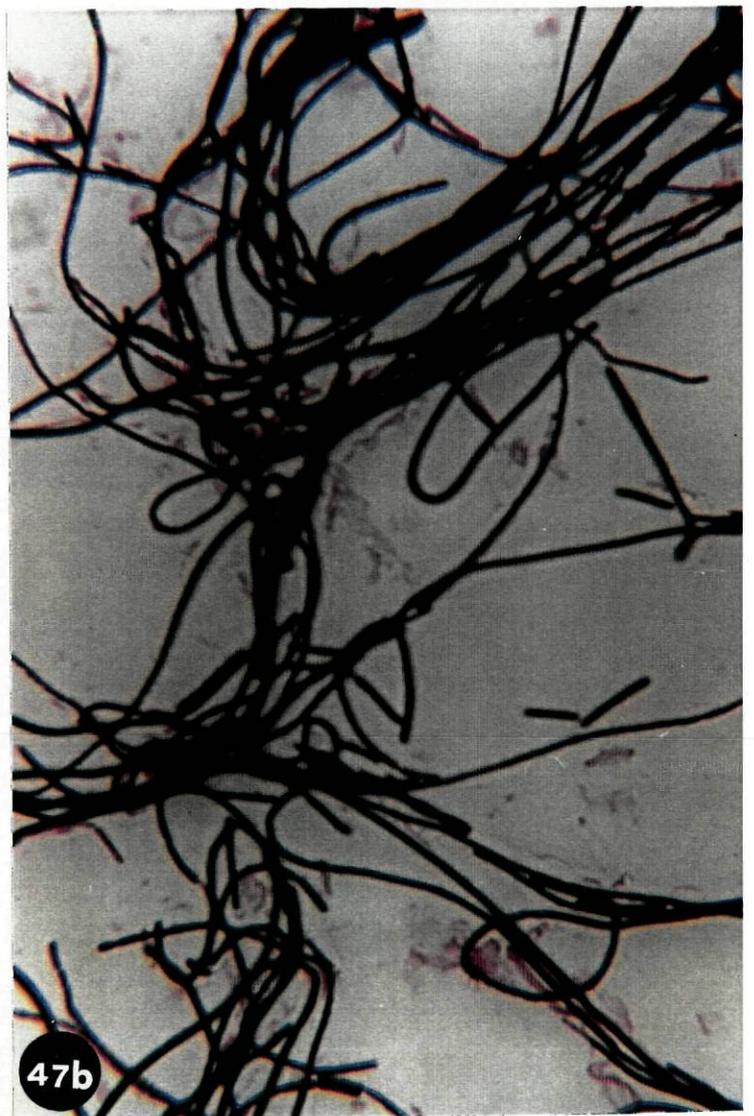
Fig.47. Células de *C. difficile* ATCC 9689, obtidas na periferia da "zona de inibição de crescimento" produzida pelo E teste, cujo crescimento se fez na presença de concentrações sub-inibitórias de vancomicina (a) e metronidazol (b). Em (a) são visíveis filamentos curtos na sua maioria Gram negativos e em (b) longas formas filamentosas Gram positivas. Ampliação 400x.



46



47a



47b

Procedemos depois à cultura da estirpe ATCC 9689, em caldo e agar Schaedler, mas desta vez na presença de uma concentração sub-inibitória conhecida, nomeadamente a correspondente ao CIM/2. Em meio sólido ambos os agentes antimicrobianos deram origem ao aparecimento de bacilos compridos (com tamanho equivalente a 3-5 bactérias da cultura controlo) e a algumas formas filamentosas (Figs 48a, 48b), não tendo sido aqui, no entanto, tão evidente, o diferente comportamento registado anteriormente em relação à coloração de Gram. Em meio líquido não foram visualizadas, nas culturas tratadas com vancomicina (Fig.49a), formas filamentosas. Os bacilos presentes, em geral mais compridos que os da cultura controlo (Fig.50), apresentaram-se curvos. Nas culturas expostas ao metronidazol foram visíveis bacilos compridos e formas filamentosas (Fig.49b). Não se verificaram diferenças significativas de comportamento frente à coloração de Gram.

1.4. Efeito na ultraestrutura

1.4.1. Células crescendo em meio líquido

A observação por microscopia electrónica de células crescendo na presença da dose sub-inibitória CIM/2 de vancomicina ou metronidazol, revelou, quando comparadas com as células de uma cultura controlo (Fig.51), grandes alterações ultraestruturais. Células provenientes de uma cultura em fase exponencial, expostas à vancomicina, apresentaram como característica constante, a presença de bacilos com múltiplas paredes transversais (Figs 52a, 52b) e septos parietais incompletos (Figs 52b, 52d). Distribuindo-se de modo caótico pela célula estes septos não obedeceram nem à disposição simétrica (Fig.52d) nem à localização equatorial (Figs 52b, 52c, 52e) característica dos septos de divisão das células normais, apresentando ainda uma incapacidade de separação mesmo quando completos. Em consequência das alterações referidas alguns bacilos apresentaram grandes dimensões e morfologia bacilar anormal (Figs 52c, 52e, 52f). Simultaneamente foi detectado um espessamento, por vezes muito pronunciado, das paredes e septos parietais (Figs 52c, 52e, 52f, 52g). Em células provenientes da fase estacionária não foi detectada multiseptação,

Fig.48. *C. difficile* ATCC 9689, após 24 h crescimento em Schaedler Agar na presença da concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina (a) e CIM/2 de metronidazol (b). Notar a presença de filamentos e de longos bacilos com tamanho equivalente a 3-5 bactérias. Coloração de Gram. Ampliação 400x.

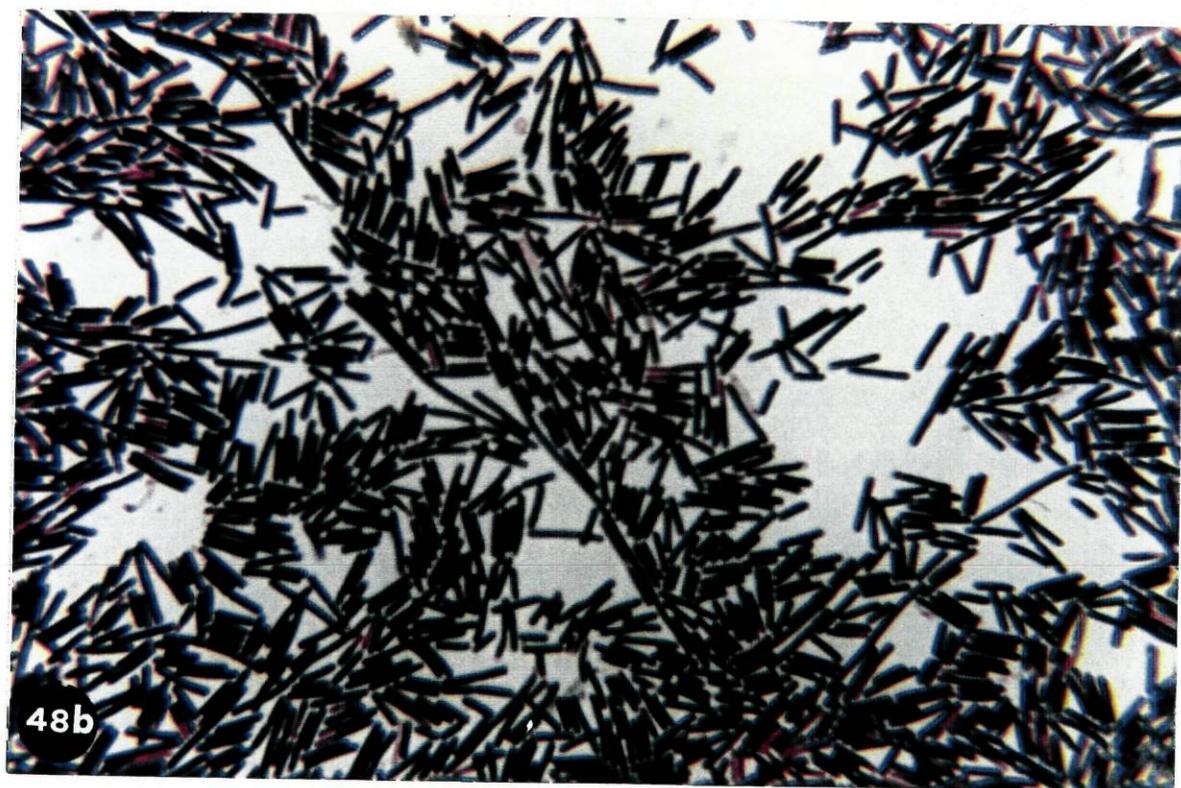
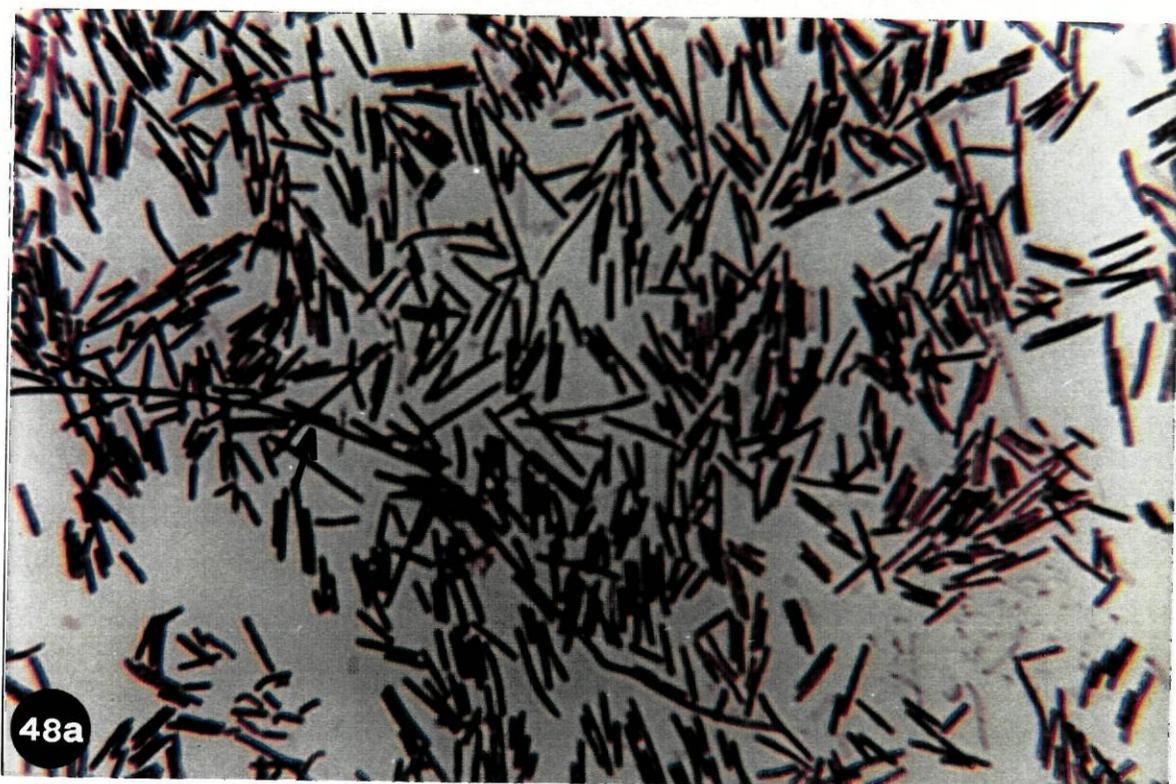
Fig.49. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler exposta à concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina (a) e CIM/2 de metronidazol (b). Notar a presença de formas bacilares curvas em (a) e de longos filamentos em (b). Ampliação 1 000x.

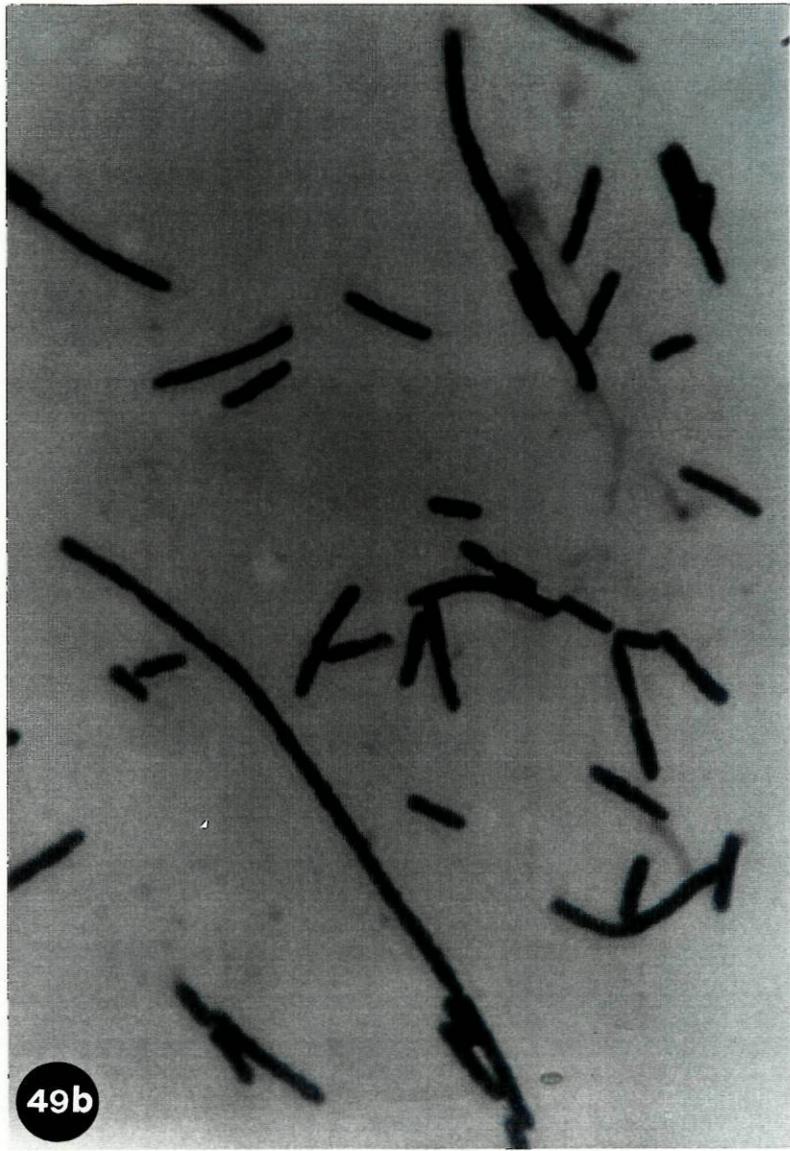
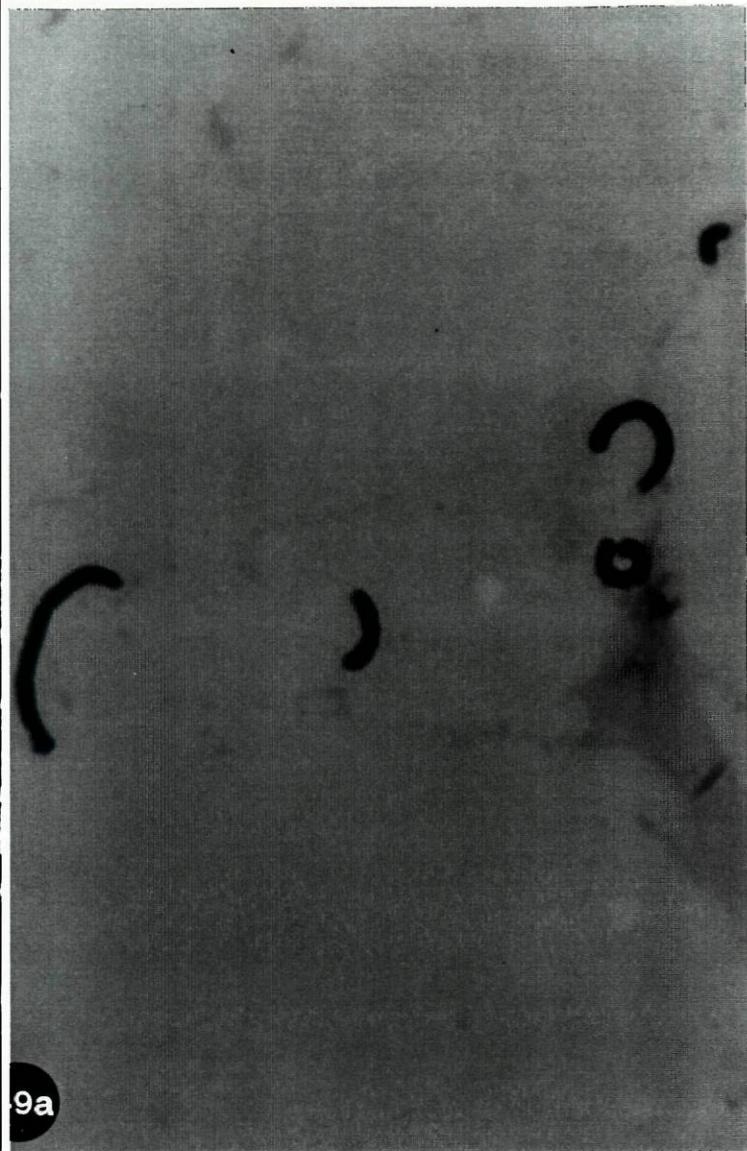
Fig.50. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler, após coloração de Gram. Ampliação 1 000x.

Fig.51. Aspecto ultraestrutural de células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler, fixadas com GAFACA/OsO₄. Ampliação 51.000 x.

Fig.52. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler, exposta à concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina. Fixação GAFACA/OsO₄. Reparar nas múltiplas paredes transversais em (a, b e c) e nos septos parietais incompletos distribuídos de modo caótico em (b e d). Em (c, e, f) são visíveis bacilos com morfologia bacilar anormal. Reparar em (c, e, f, g) no espessamento das paredes celulares e septos parietais. Ampliação: (a) 51.000 x; (b) 32.000 x; (c) 41.000 x; (d) 51.000 x; (e) 51.000 x; (f) 51.000 x; (g) 51.000 x.

Fig.53. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura em fase estacionária em caldo Schaedler, exposta à concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina. Fixação GAFACA/OsO₄. Notar o espessamento das paredes celulares em (a e b) e o aparecimento da forma bacilar curva em (a). Ampliação: (a) 51.000 x; (b) 51.000 x





9a

49b

50



51



52a

52b



52c



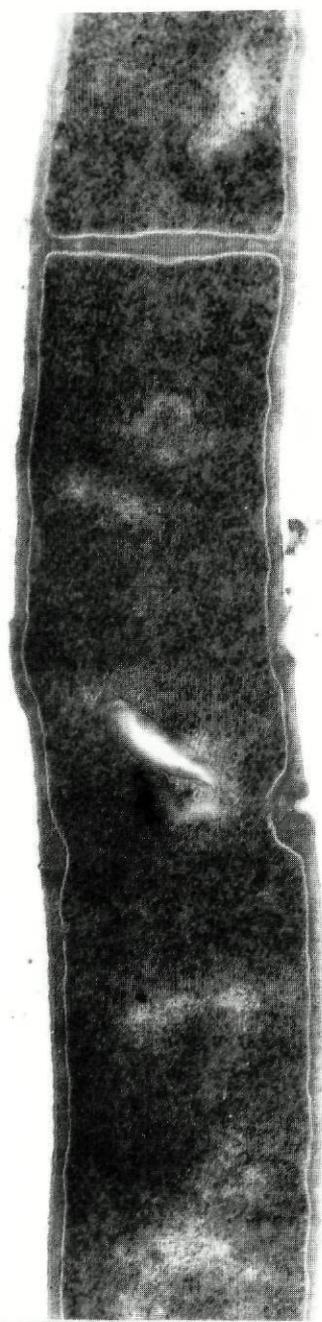
52d



52e



52f



52g



53a



53b

sendo apenas visível o espessamento das paredes celulares acompanhada por vezes de uma perda da morfologia bacilar típica (Figs 53a, 53b).

Células expostas ao metronidazol, provenientes da fase exponencial de crescimento, apresentaram-se de um modo geral mais compridas (Figs 54a, 54b, 55) que as células da cultura controlo (Fig.51) aparecendo por vezes sob a forma de grandes filamentos. Nalguns destes não foi possível detectar a presença de septos de divisão (Fig.54b), assistindo-se como que a uma inibição da sua síntese e noutros os septos de divisão completos presentes foram incapazes de sofrer separação (Figs 54a, 55). Nas amostras fixadas com GAFACA/OsO₄ (Figs 54a-d) foi possível observar um fenómeno de aderência entre as células, particularmente visível nas Figs 54a, 54c, 54d. Se nalguns casos pareceu tratar-se de uma simples aderência entre a camada superficial, S-layer, das células contíguas (Fig.54c) noutros o fenómeno foi acompanhado de uma deformação das paredes celulares na zona de adesão (Figs 54a, 54d).

1.4.2. Células crescendo em meio sólido

O estudo ultraestrutural de células provenientes de Schaedler agar contendo a dose sub-inibitória CIM/2 de vancomicina ou metronidazol mostrou, para ambos os agentes antimicrobianos, para além da presença de bacilos com ultraestrutura normal, o aparecimento de grandes filamentos (Figs 56, 57a, 57b). Estes apresentaram-se sem septo de divisão (Fig.57a) ou com septos completos sem sinais de separação (Figs 56, 57b). Nas células expostas à vancomicina detectou-se ocasionalmente, um espessamento das paredes periféricas (Fig.58a) e a formação de pequenas protuberâncias parietais contíguas, correspondentes a futuros septos de divisão (Fig.58b).

Fig.54. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler, exposta à concentração sub-inibitória CIM/2 de metronidazol. Fixação GAFACA/OsO₄. Notar a presença de longos bacilos bem evidente em (a e b) e no fenómeno de aderência em (a, c, d). Em (d) é bem visível a deformação da parede celular na zona de adesão (setas). Ampliação: (a) 19.000 x; (b) 23.000 x; (c) 40.000 x; (d) 31.000 x.

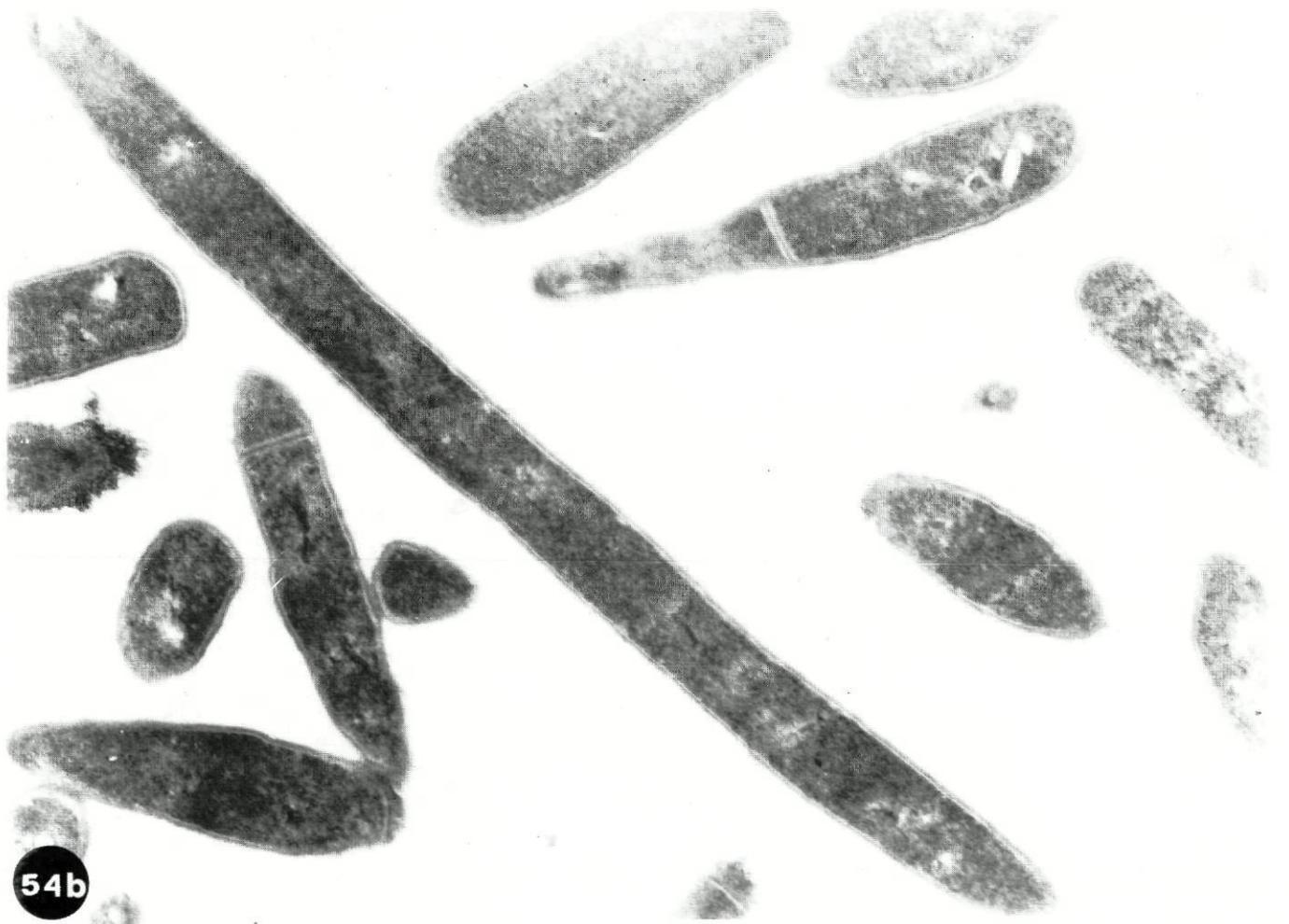
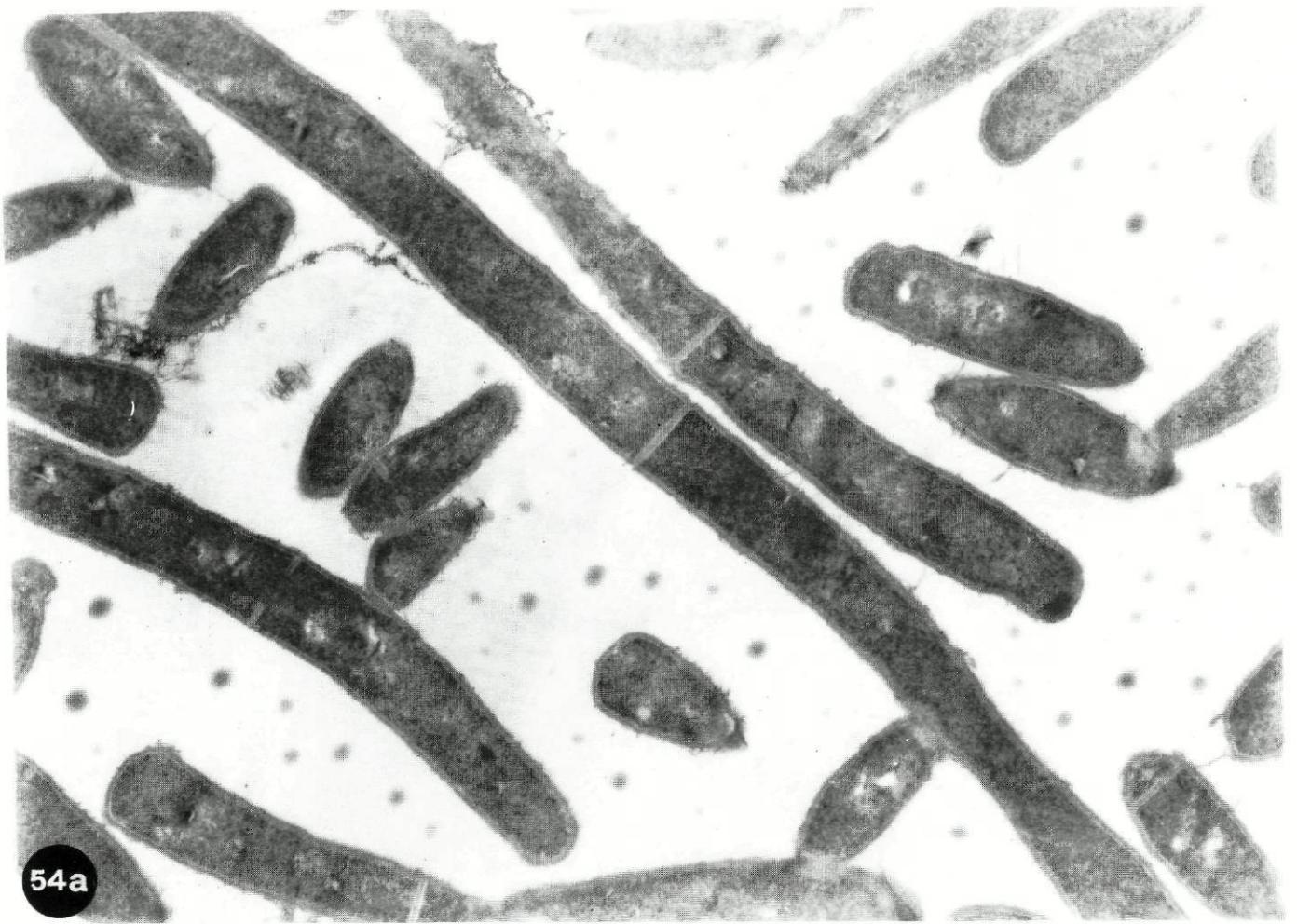
Fig.55. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial em caldo Schaedler, exposta à concentração sub-inibitória CIM/2 de metronidazol. Fixação OsO₄/GAFACA. Reparar no longo filamento. Ampliação 18.000 x.

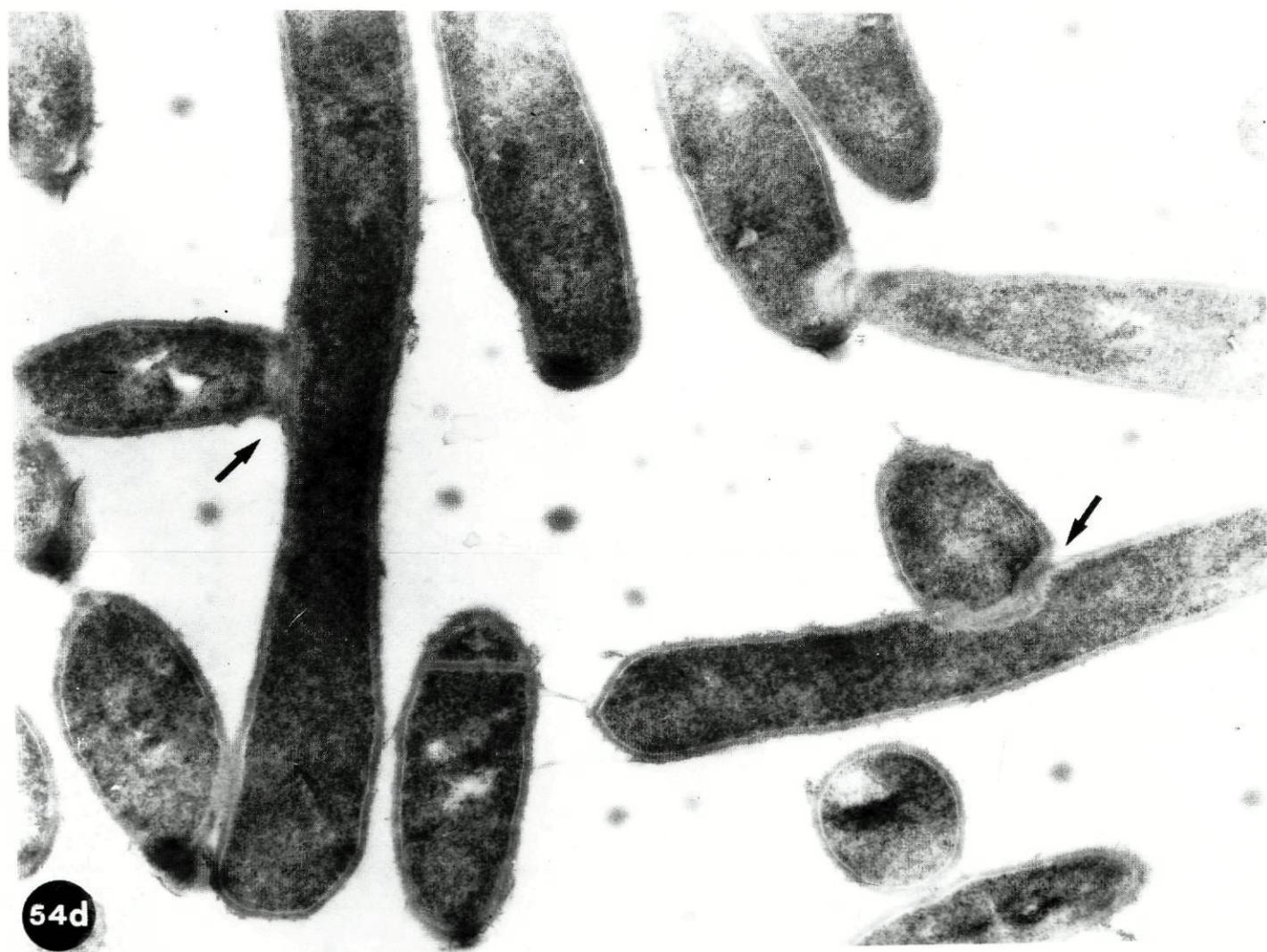
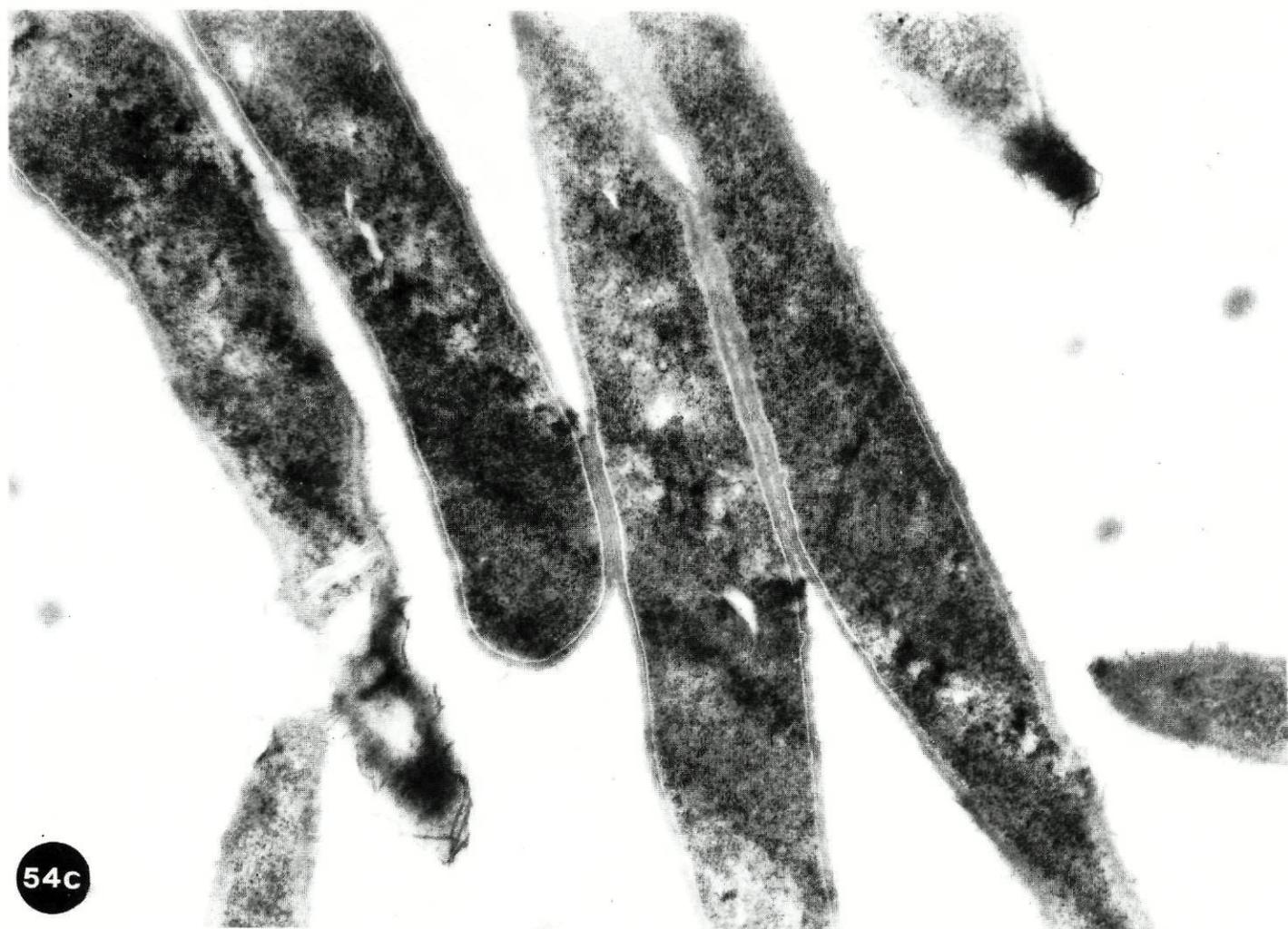
Fig.56. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, após 24 h crescimento em Schaedler Agar na presença da concentração sub-inibitória CIM/2 de metronidazol. Fixação GAFACA/OsO₄. Reparar no longo filamento e no septo de divisão numa das extremidades (seta). Ampliação 18.000 x.

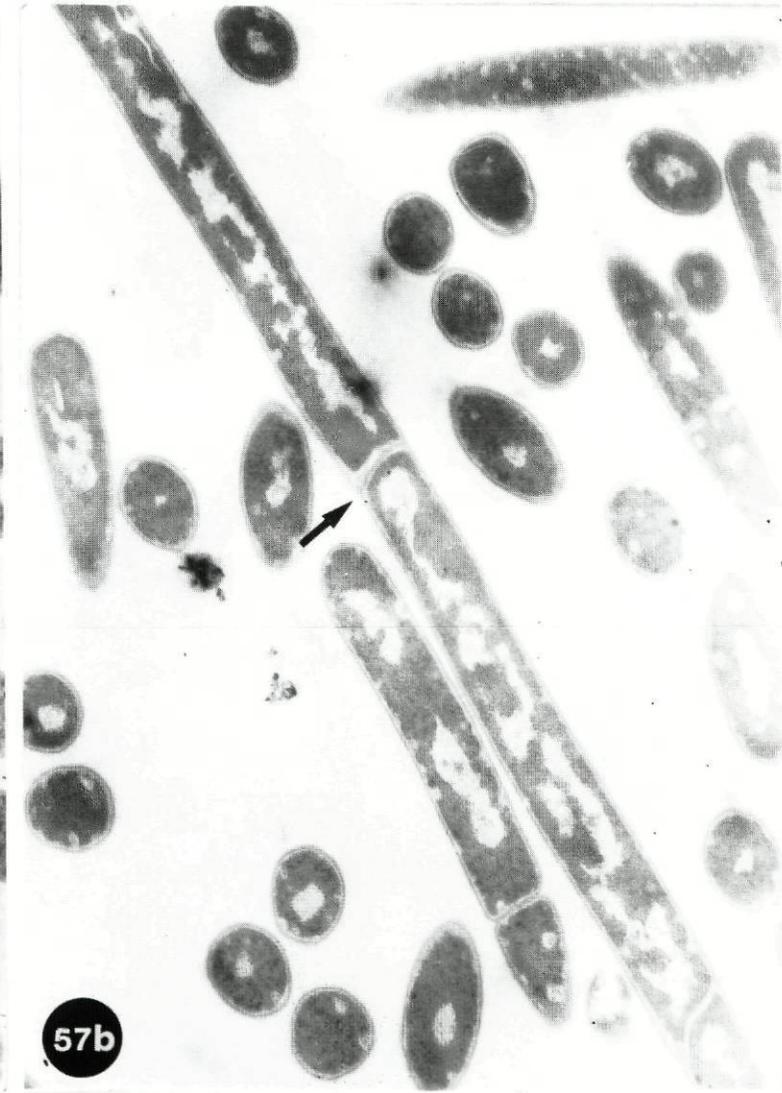
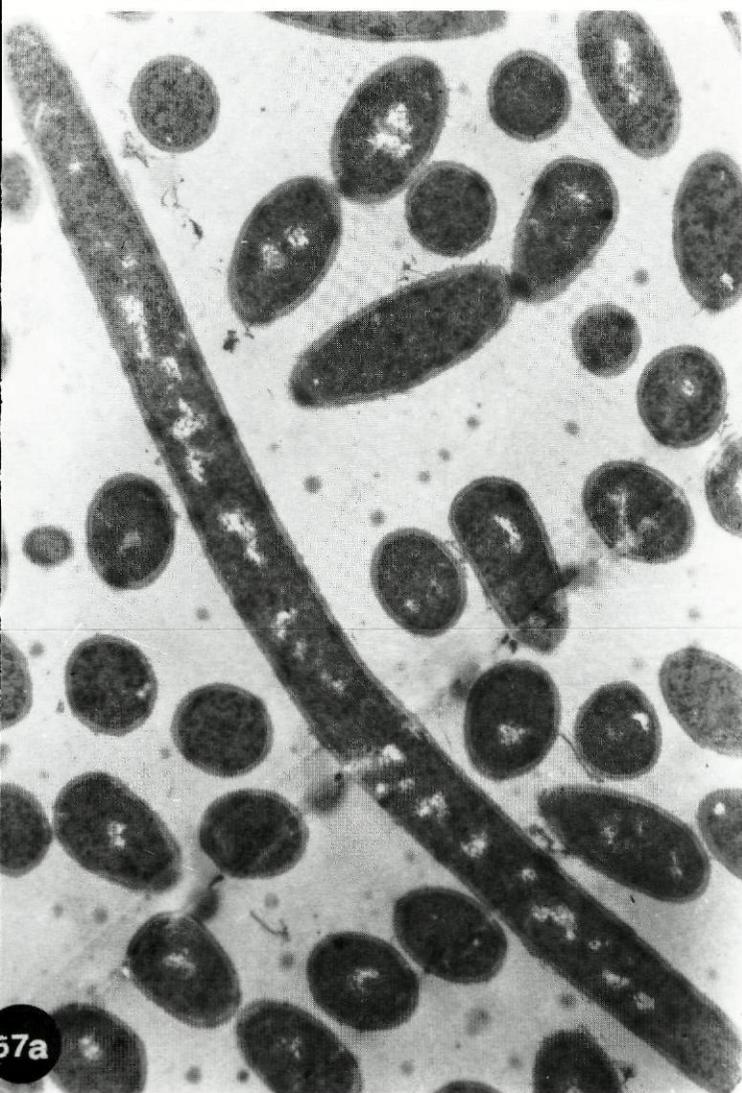
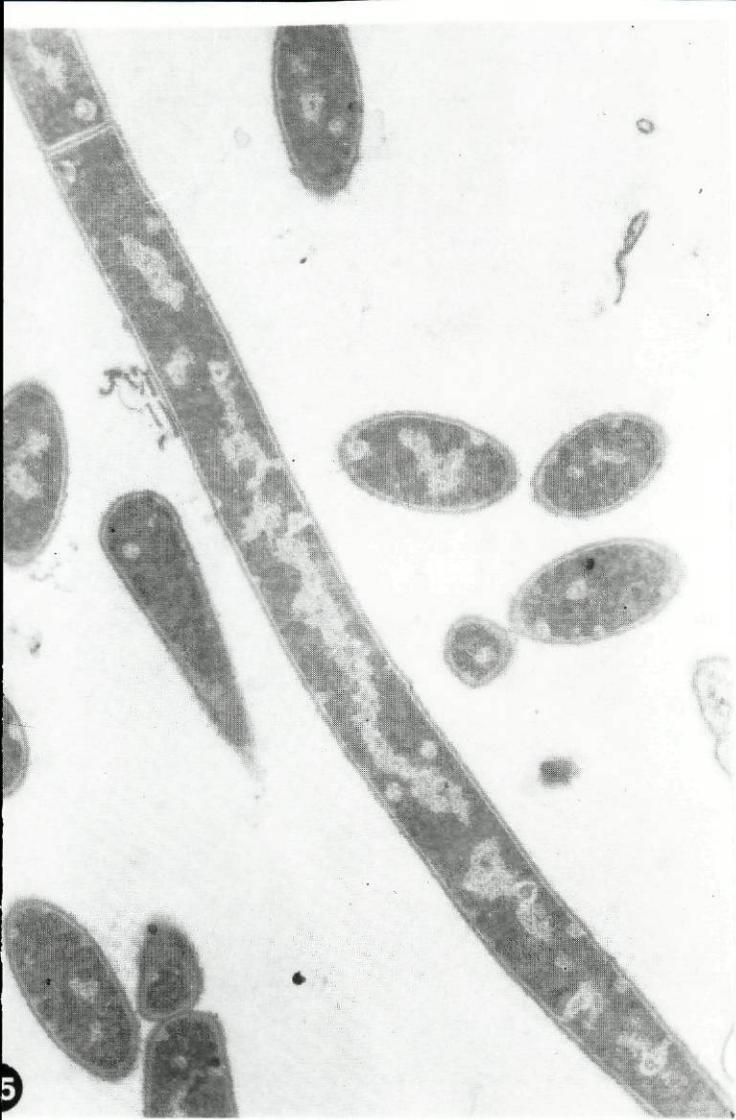
Fig.57. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, após 24 h crescimento em Schaedler Agar na presença da concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina. Fixação GAFACA/OsO₄ em (a) e OsO₄/GAFACA em (b). Reparar na presença de formas filamentosas. Em (a) não é visível nenhum septo de divisão; em (b) o septo completo não apresenta sinais de separação (seta). Ampliação: (a) 17.000 x; (b) 16.000 x.

Fig.58. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, após 24 h crescimento em Schaedler Agar na presença de concentrações sub-inibitórias de vancomicina. Fixação GAFACA/OsO₄. Em (a) é bem visível o espessamento da parede celular (setas); em (b) dois septos de divisão contíguos parecem estar a formar-se (setas). Ampliação: (a) 38.000 x; (b) 25.000 x.

Fig.59. Aspecto ultraestrutural de protoplastos de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, obtidos a partir de células expostas à concentração sub-inibitória CIM/2 de metronidazol. Solução osmótica constituída por caldo Schaedler, sacarose 0.5 M e glicina 0.4%. Fixação com GAFACA/OsO₄. Reparar na integridade do protoplasto (P). Notar o perfil assimétrico da membrana citoplasmática (MC), os ribossomas (R) visivelmente distintos e o nucleóide (N) com aspecto fibrilar. Ampliação 34 000 x.

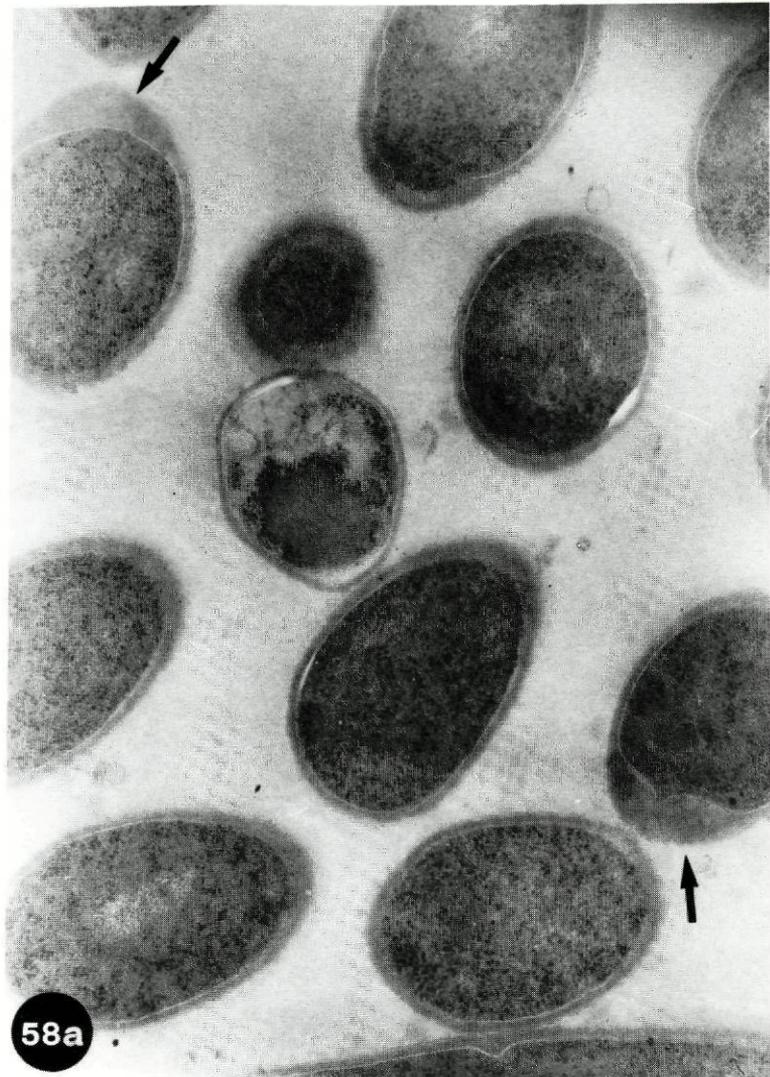




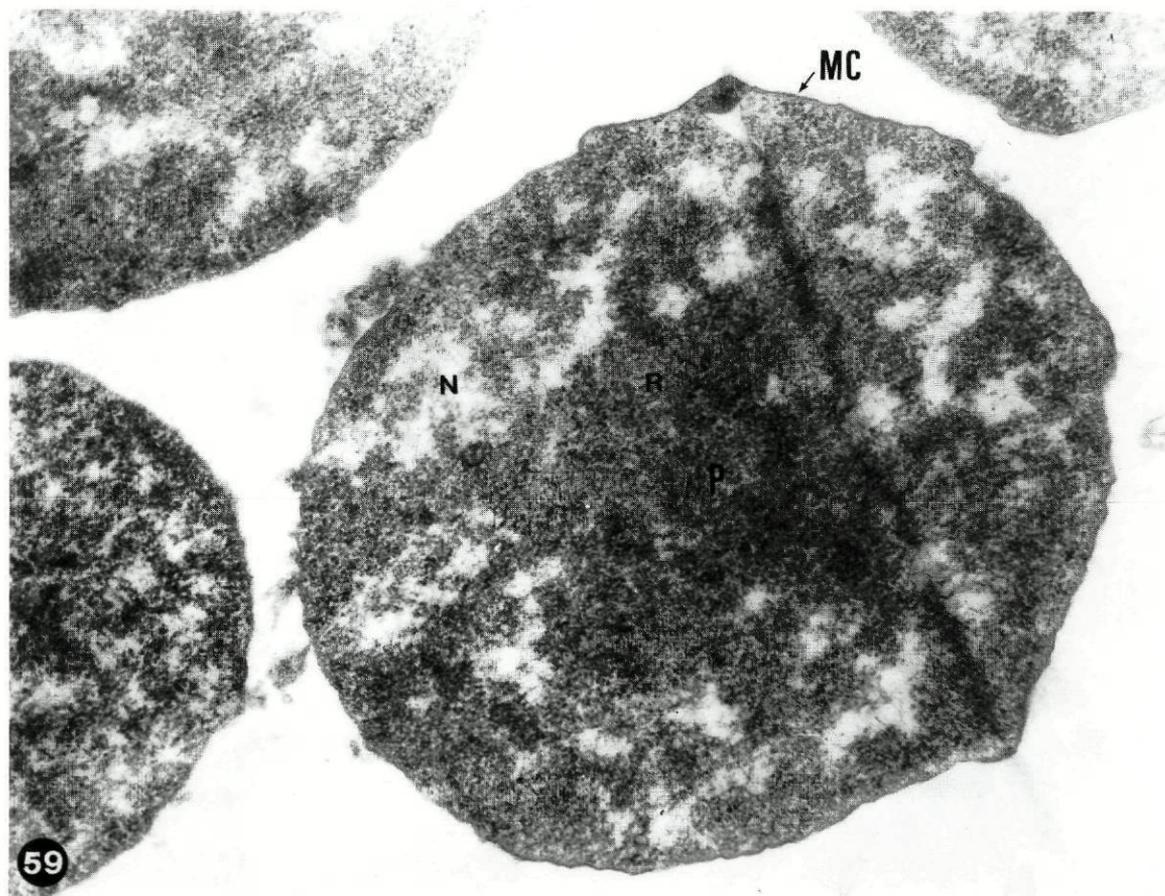




58b



58a



59

1.5. Efeito na produção de protoplastos

Tentámos averiguar se a produção de protoplastos seria de algum modo perturbada pela exposição prévia das células a doses sub-inibitórias (CIM/2) de vancomicina e metronidazol. Para tal células em fase de crescimento logarítmico crescendo na presença destas doses foram usadas na obtenção de protoplastos. Uma vez que ficou demonstrado que o pré-condicionamento das células em glicina, antes do tratamento pela lisozima, não influencia a taxa de formação de protoplastos estando esta apenas dependente da presença de glicina na solução osmótica (ver 6.1., Parte I) não complementámos o meio de crescimento com este aminoácido, tendo este sido sómente adicionado à solução osmótica final constituída por caldo Schaedler e sacarose. De notar que a diluição (1:5) realizada durante o processo de obtenção dos protoplastos não é suficiente para a remoção total dos agentes antimicrobianos, tendo-se assim, no estabilizador osmótico, uma concentração final equivalente a CIM/10.

Protoplastos semelhantes ao controlo (ver Fig.21, Parte I) foram obtidos com células previamente expostas ao metronidazol. Mesmo a dose sub-inibitória CIM/10 de metronidazol, presente na solução osmótica, não mostrou afectar ultraestruturalmente o protoplasto que apareceu ainda intacto ao fim de 16h (Fig.59).

Células previamente expostas a concentrações sub-inibitórias de vancomicina, não possibilitaram, em condições idênticas, a obtenção de protoplastos.

2. Alterações fisiológicas e morfológicas induzidas por concentrações supra-inibitórias de vancomicina e metronidazol

2.1. Efeito na viabilidade e crescimento bacteriano

Culturas exponenciais de *C. difficile* ATCC 9689 foram expostas durante 1h e 2h a concentrações supra-inibitórias de vancomicina (5x, 10x e 30x CIM) e metronidazol (5x, 10x e 40x CIM). Os agentes antimicrobianos foram depois removidos por diluição (10^{-3}) e o crescimento bacteriano da nova cultura, monitorizado por contagem de células viáveis, iniciou-se imediatamente após a remoção do fármaco estendendo-se até por volta das 5-7h seguintes, altura em que as culturas começaram a apresentar uma turvação visível.

2.1.1. Efeito da vancomicina

Na Fig.60 estão representadas as curvas de crescimento da estirpe ATCC 9689 em fase de PAE ou seja imediatamente após ter terminado a exposição às várias concentrações de vancomicina. Comparativamente à cultura controlo, verifica-se que, para as concentrações de 5x CIM (Fig.60A) e 10x CIM (Fig.60B), a actividade bactericida da vancomicina é dependente do tempo de exposição ao antibiótico, sendo maior para exposições de 2h. O decréscimo provocado por cada uma destas concentrações no número de células viáveis (Quadro III), mostra na realidade uma descida significativa (0.67 para 1.50 \log_{10} e 0.6 para 1.10 \log_{10} ; $p < 0.01$) quando o tempo de exposição é aumentado de 1h para 2h. Não se regista, no entanto, qualquer diferença significativa na actividade bactericida da vancomicina quando se aumenta a concentração de 5x para 10x CIM (Fig.60C) e de 5x para 30x CIM (Fig.60D) e se mantém idêntico o período de exposição (2h e 1h, respectivamente).

A prévia exposição à vancomicina parece afectar o novo crescimento bacteriano, verificando-se em todos os casos, durante a primeira hora, um aumento mais rápido de c.f.u. comparativamente à cultura controlo.

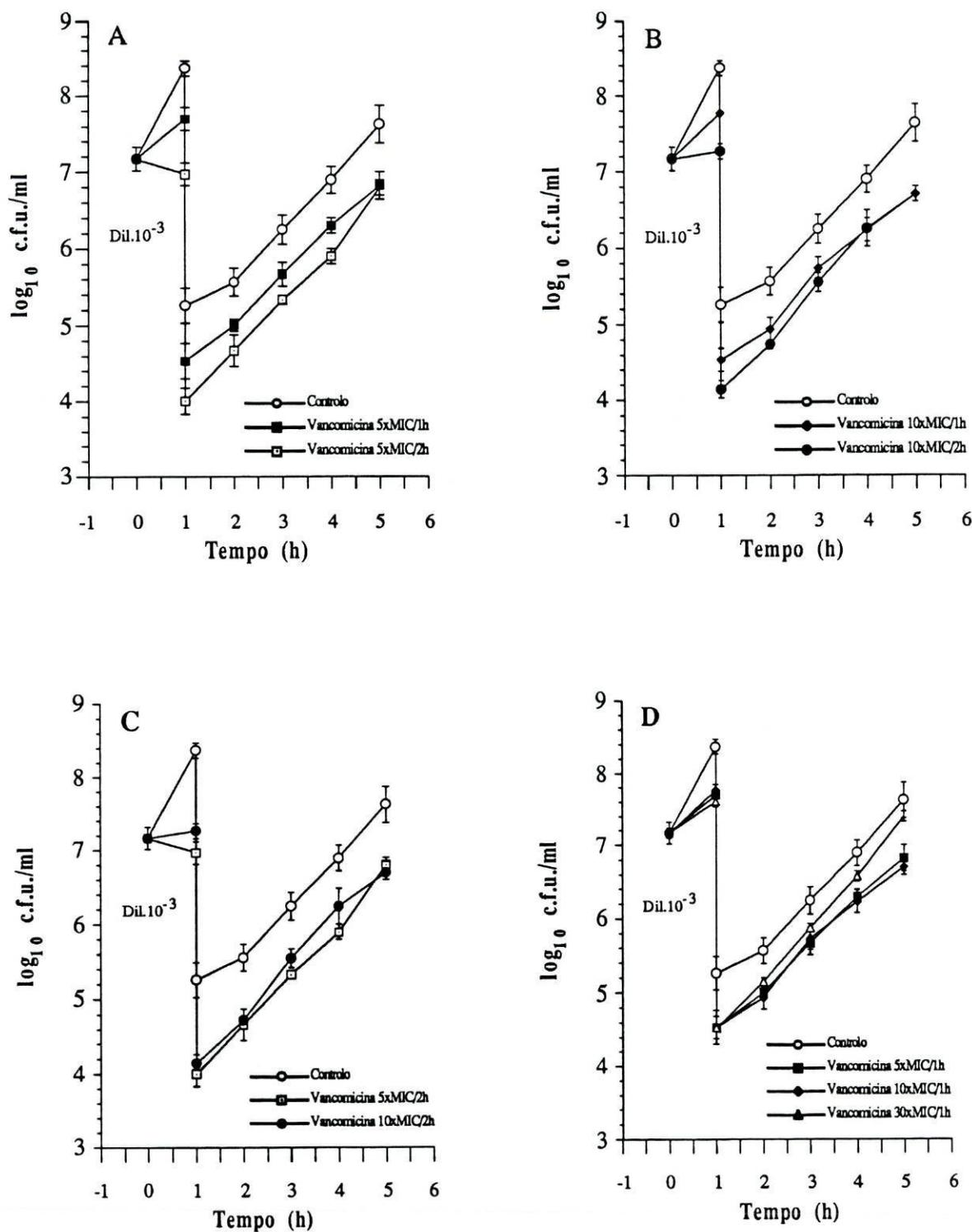


Fig.60. Crescimento em fase de PAE de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689 após exposição de 1h e 2h às concentrações supra-inibitórias de vancomicina correspondentes a 5x, 10x e 30xMIC. Os valores representam a média \pm SD de um mínimo de três determinações realizadas em diferentes dias.

2.1.2. Efeito do metronidazol

Na Fig.61 estão representadas as curvas de crescimento da estirpe ATCC 9689, em fase de PAE, após exposição às várias concentrações supra-inibitórias de metronidazol. Verifica-se, comparativamente ao controlo, que o decréscimo do número de células viáveis, registado imediatamente após remoção do metronidazol, não é muito pronunciado, para concentrações de 5x e 10x CIM e que o aumento do período de exposição ao agente antimicrobiano, de 1 h para 2 h, não influencia significativamente a viabilidade bacteriana (Quadro III e Fig 61A e 61B). Registou-se apenas uma descida acentuada no número de células viáveis ($2.42 \log_{10}$), nas culturas expostas 1h à concentração de 40x CIM (Fig 61D).

O modo como o crescimento bacteriano é afectado após exposição ao metronidazol parece estar dependente da concentração deste agente antimicrobiano. Enquanto que nas culturas expostas à concentração de 5x CIM se assiste, na hora que se segue à remoção do metronidazol, a um ligeiro aumento do número de células viáveis (Fig.61A), nas culturas tratadas com 10x CIM, esse número decresce durante esse período (Fig.61B). Só depois tem início, em ambas as culturas, o crescimento exponencial semelhante ao do controlo. Com a concentração de 40x CIM este crescimento exponencial só se inicia 3h após a remoção do fármaco (Fig.61D).

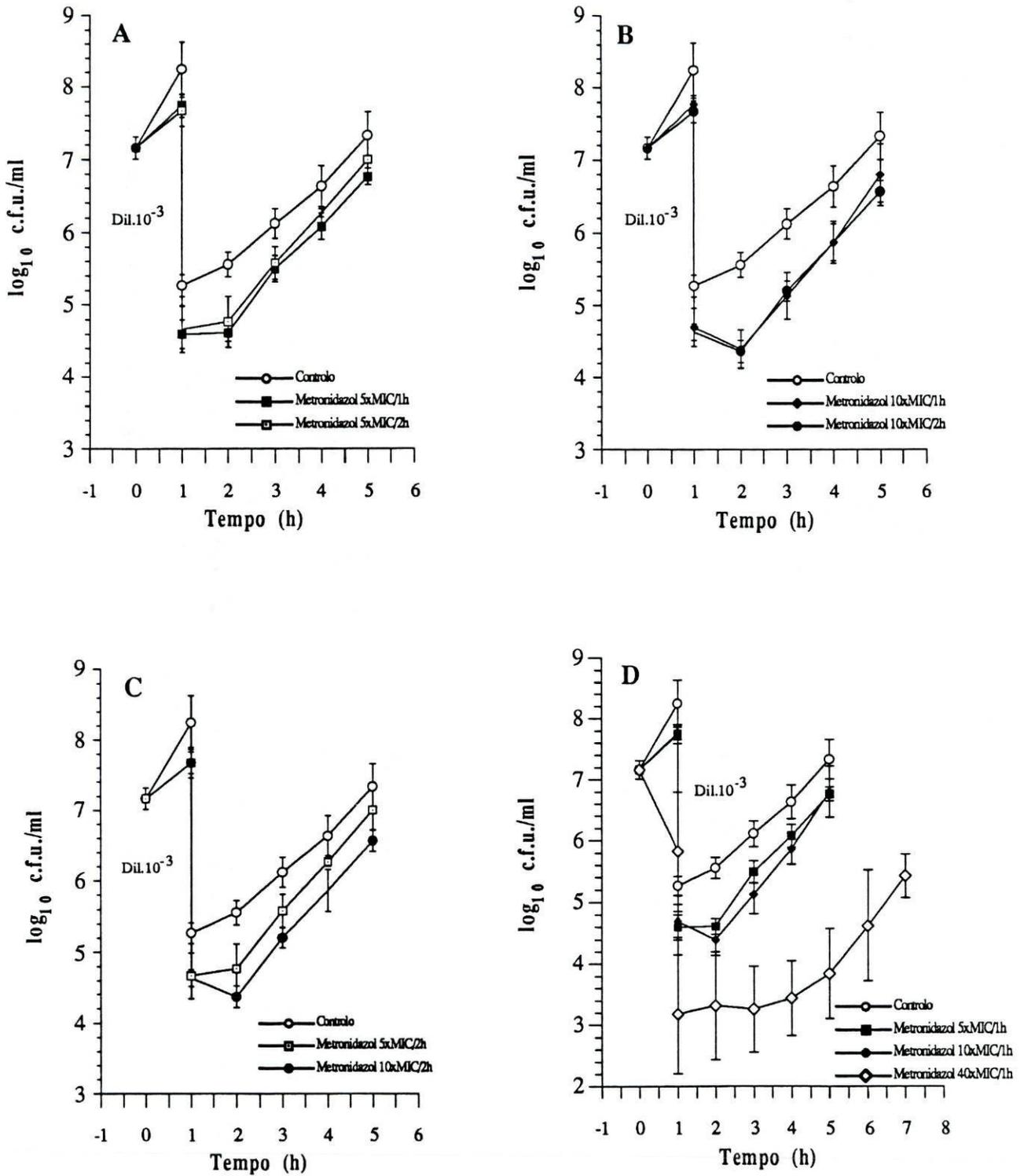


Fig.61. Crescimento em fase de PAE de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689 após exposição de 1h e 2h às concentrações supra-inibitórias de metronidazol correspondentes a 5x, 10x e 40xMIC. Os valores representam a média \pm SD de um mínimo de três determinações realizadas em diferentes dias.

2.2. Efeito na morfologia bacteriana

Todas as culturas expostas às diferentes concentrações supra-inibitórias de vancomicina, exibiram a presença de filamentos (Fig.62). Estes apresentando um comprimento equivalente a 3-5 bactérias da cultura controlo (Fig.63) coraram na generalidade de Gram negativo.

A exposição às concentrações de metronidazol de 5x e 10x CIM, levou também ao aparecimento de formas filamentosas que coraram de Gram positivo (Fig.64). Na concentração de 40x CIM a filimentação não foi tão evidente tendo os bacilos apresentado uma coloração pouco uniforme (Fig.65).

2.3. Efeito na ultraestrutura

A observação de cortes ultrafinos de bactérias provenientes das culturas tratadas, durante 1h e 2h, com as várias concentrações supra-inibitórias de vancomicina e metronidazol mostrou a presença de certas alterações ultraestruturais. Em todas as culturas tratadas com vancomicina foi visível o aparecimento de formas filamentosas (Fig.66) o mesmo se verificando nas culturas tratadas com concentrações de metronidazol de 5x e 10x CIM (Fig.67). Tais filamentos não foram observados nas células controlo (Fig.68). Nas células tratadas com a concentração de metronidazol de 40x CIM foi detectado, a nível da maior parte das células, uma alteração da parede celular a qual se traduziu pela perda da morfologia bacilar (Fig.69).

Fig.62. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura em caldo Schaedler exposta, durante 2h, à dose supra-inibitória 10xCIM de vancomicina. Notar a presença de formas filamentosas coradas de Gram negativo. Ampliação 1 000x.

Fig.63. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura em caldo Schaedler não exposta a nenhum agente antimicrobiano. Coloração de Gram. Ampliação 1000x.

Fig.64. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exposta, durante 2h, à dose supra-inibitória 10xCIM de metronidazol. Notar a presença de formas filamentosas coradas de Gram positivo. Ampliação 1 000x.

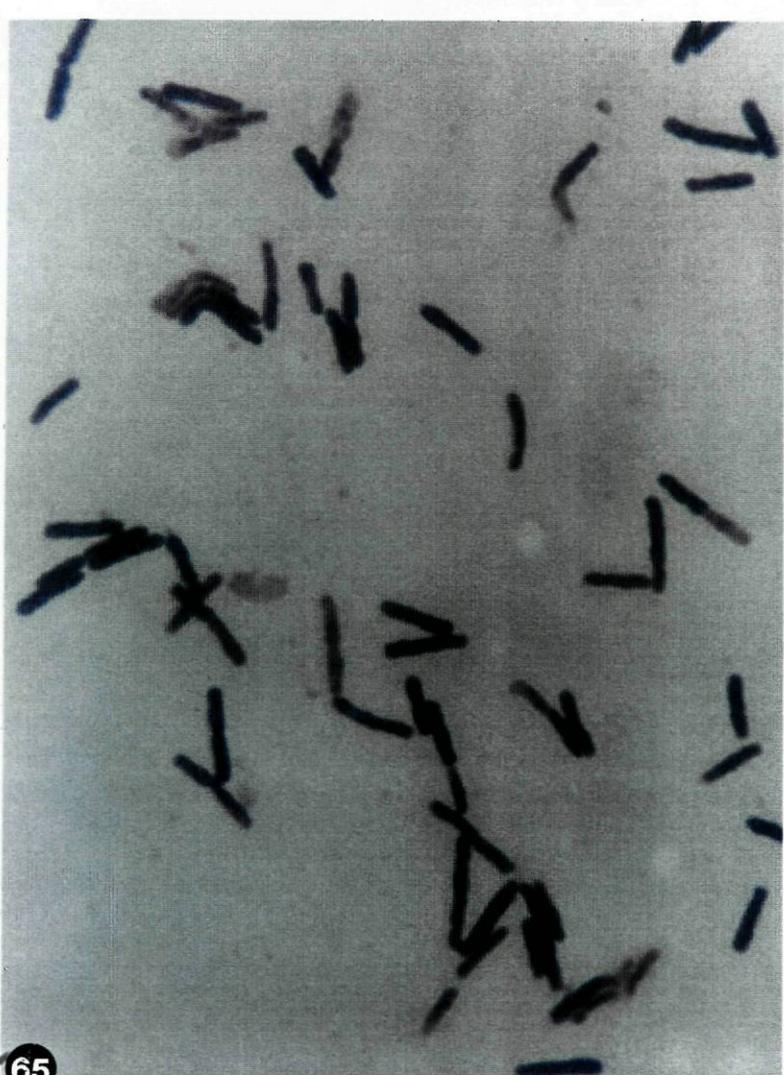
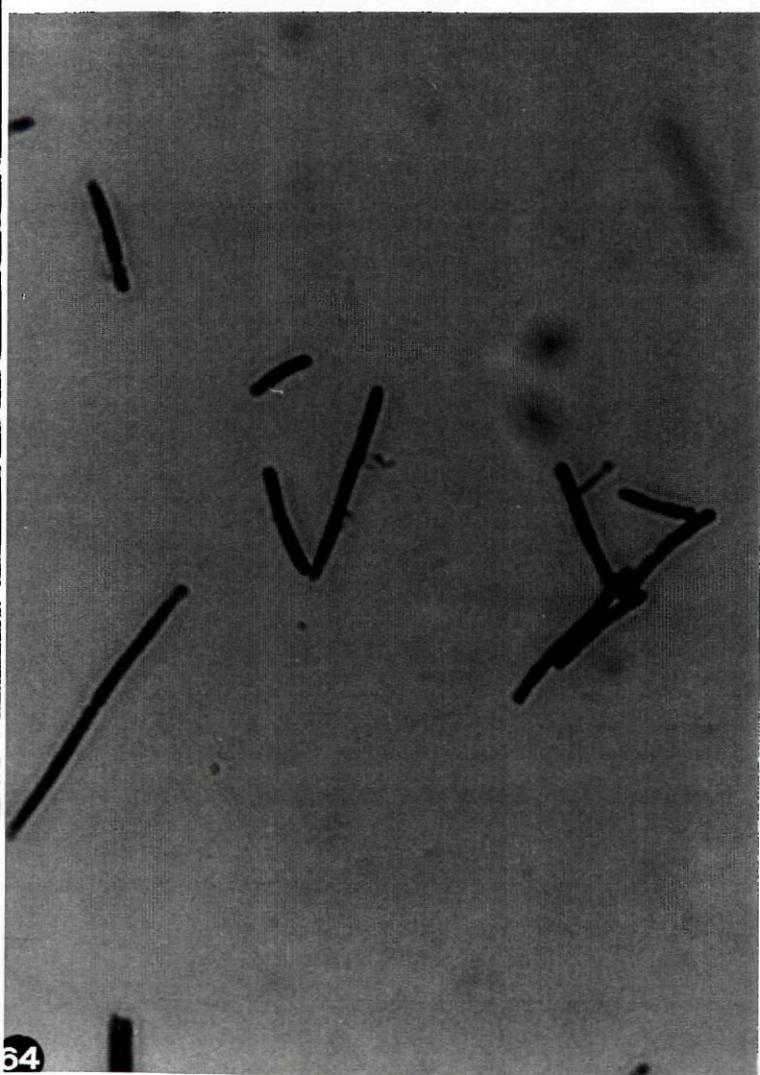
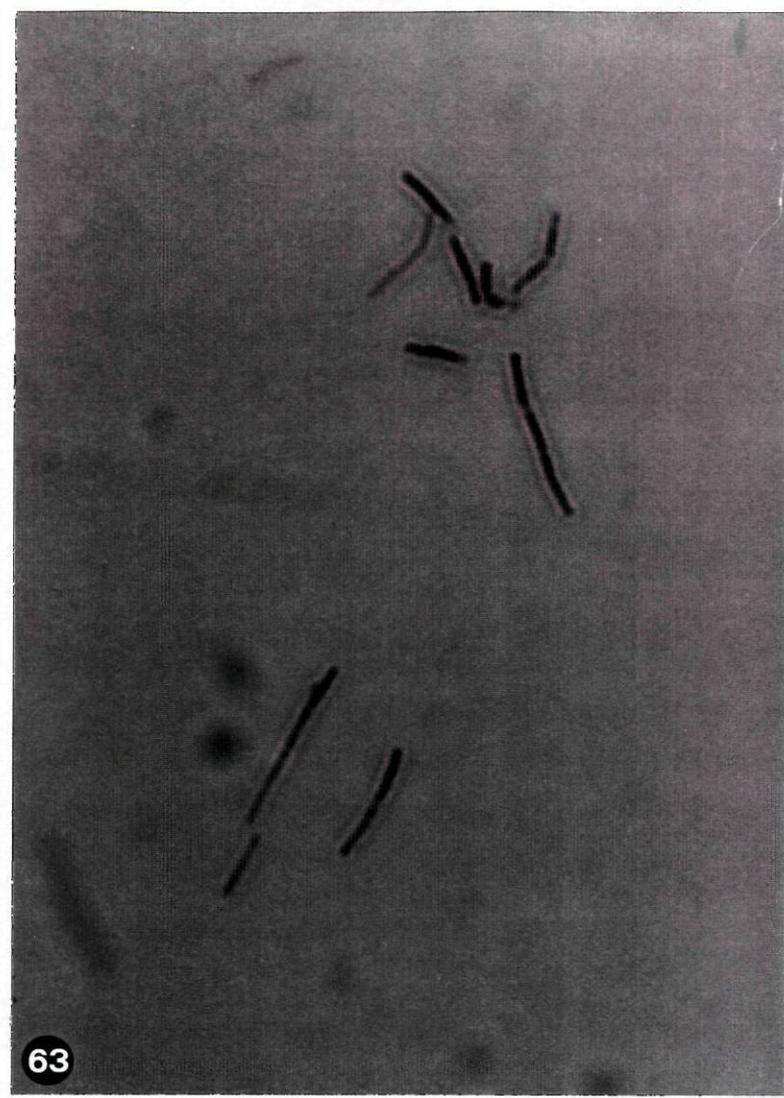
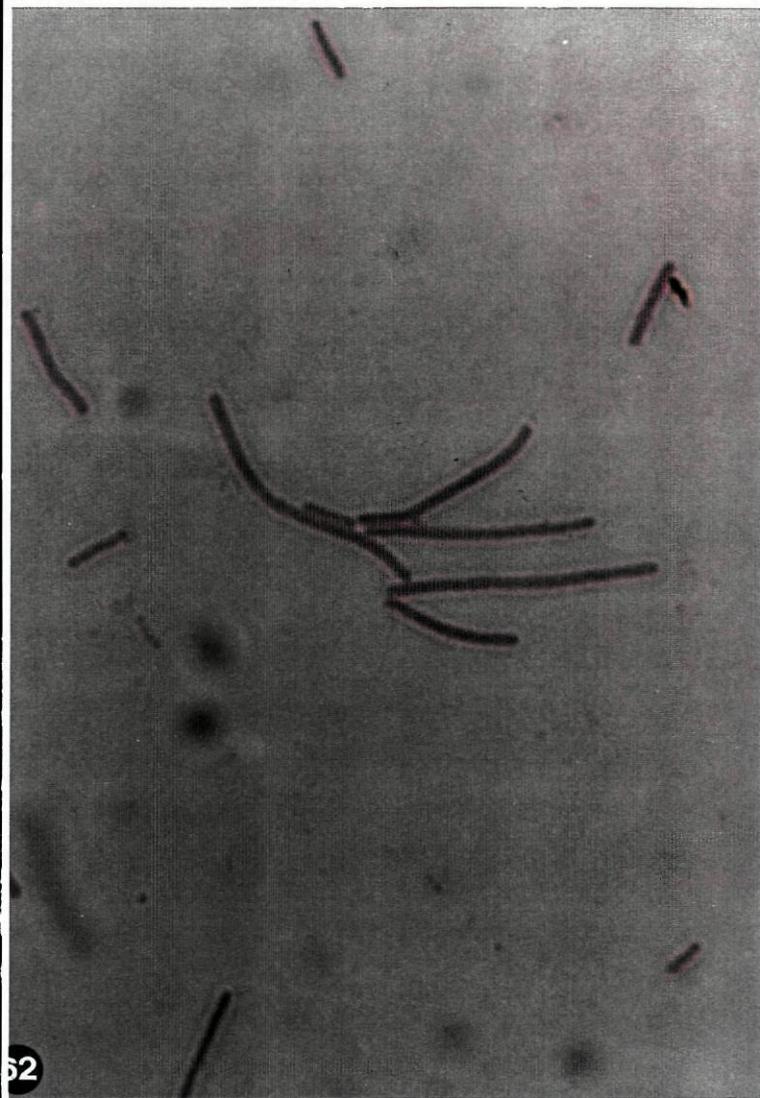
Fig.65. Células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exposta, durante 1h, à dose supra-inibitória 40xCIM de metronidazol. Reparar na coloração pouco uniforme de alguns bacilos e na ausência de filamentos. Ampliação 1 000x.

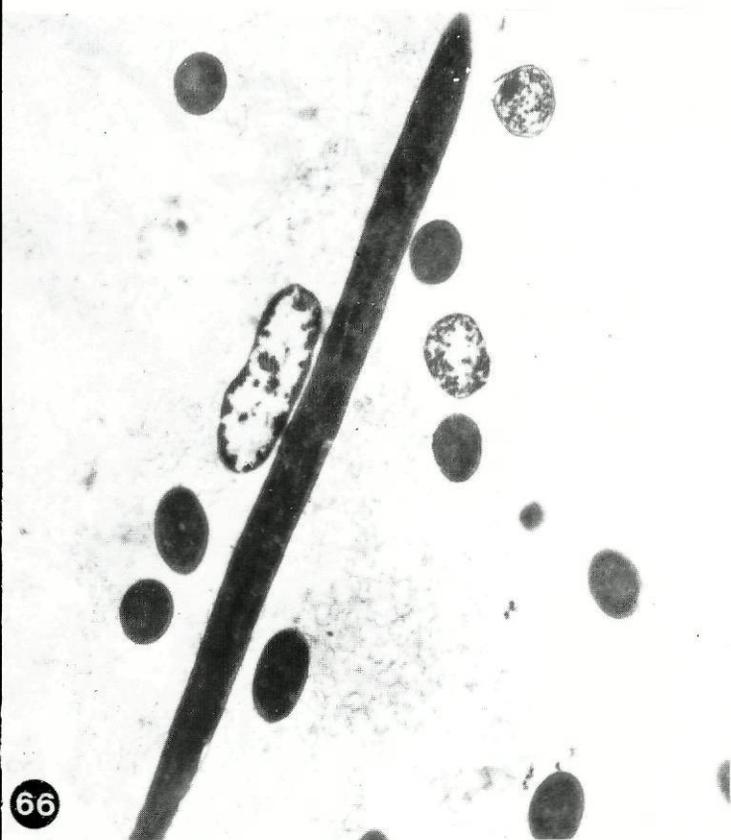
Fig.66. Aspecto ultraestrutural de células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial exposta, durante 1h, à dose supra-inibitória 30xCIM de vancomicina. É visível uma forma filamentosa. Ampliação 11.000 x.

Fig.67. Aspecto ultraestrutural de células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial exposta, durante 1h, à dose supra-inibitória 5xCIM de metronidazol. É visível uma forma filamentosa. Ampliação 12.000 x.

Fig.68. Aspecto ultraestrutural de células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial não exposta a nenhum agente antimicrobiano. Ampliação 12.000 x.

Fig.69. Aspecto ultraestrutural de células de *C. difficile*, estirpe ATCC 9689, provenientes de uma cultura exponencial exposta, durante 1h, à dose supra-inibitória 40xCIM de metronidazol. Reparar na perda da morfologia bacilar típica. Ampliação 16.000x.





2.4. Efeito pós-antibiótico (PAE) da vancomicina e do metronidazol

Tentámos determinar o PAE da vancomicina (concentrações de 5x, 10x e 30x CIM) e do metronidazol (concentrações de 5x, 10x e 40x CIM) em *C. difficile* para períodos de exposição de 1h e 2h. Foi necessário previamente verificar se a diluição de 10^{-3} , utilizada para a remoção da droga, seria suficiente para evitar qualquer efeito antibacteriano sobre o crescimento de *C. difficile*, por parte da droga residual, mesmo nos casos em que eram utilizadas altas concentrações de vancomicina e metronidazol.

2.4.1. Efeito residual dos agentes antimicrobianos

Quando o crescimento de *C. difficile* em meio Schaedler foi comparado com o crescimento obtido em meio idêntico mas contendo desta vez uma diluição 10^{-3} da mais alta concentração de vancomicina ou metronidazol usada nas determinações de PAE (30x e 40x CIM, respectivamente) não se detectou diferença significativa em nenhum dos pontos ($p > 0.05$) das curvas obtidas (Fig.70). Tal facto garantiu-nos não ser a droga residual capaz de afectar a determinação dos valores de PAE.

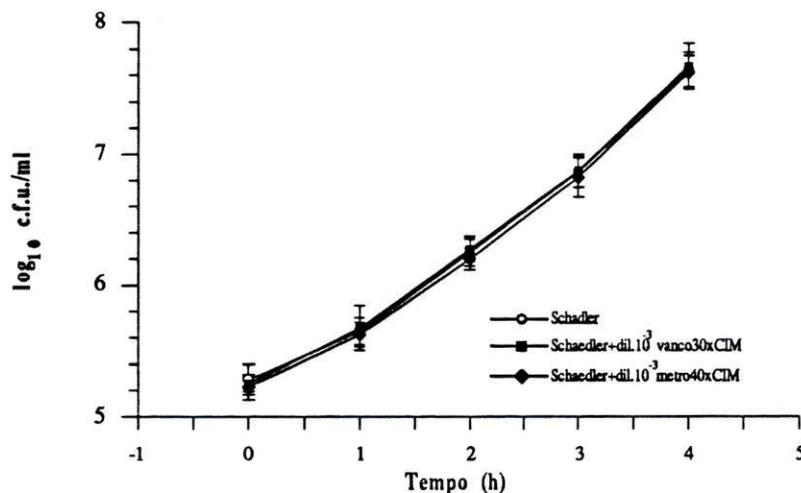


Fig.70. Crescimento de *C. difficile* em meio Schaedler sem antibiótico versus meio Schaedler contendo uma diluição de 10^{-3} da concentração correspondente a 30x CIM vancomicina e 40x CIM metronidazol.

2.4.2. Determinação do PAE

2.4.2.1. Na estirpe ATCC 9689

Os PAEs das várias concentrações de vancomicina e metronidazol em *C. difficile* ATCC 9689, após um período de exposição de 1h e 2h, estão registados no Quadro III.

Quadro III. PAEs e actividade bactericida da vancomicina e metronidazol em *C. difficile* ATCC 9689 após um período de exposição de 1h e 2h.

Agente anti-microbiano	Agente antimicrobiano concentração (mg/L)	Tempo de exposição (h)	PAE ^a (h)	Decréscimo nº cél viáveis (log ₁₀ c.f.u.) ^b
Vancomicina	3.75 (5xMIC)	1	-0.37±0.15	0.67±0.15
		2	-0.45±0.07	1.50±0.15
	7.5 (10xMIC)	1	-0.27±0.06	0.60±0.15
		2	-0.43±0.15	1.10±0.10
	22.5 (30xMIC)	1	-0.73±0.21	0.86±0.09
	Metronidazol	0.95 (5xMIC)	1	-0.02±0.34
2			-0.18±0.13	0.58±0.22
1.9 (10xMIC)		1	0.57±0.15	0.47±0.12
		2	0.87±0.12	0.57±0.15
7.6 (40xMIC)		1	2.50±0.22	2.42±0.97

^a os resultados representam a média ±SD de um mínimo de três experiências realizadas em dias diferentes.

^b decréscimo no nº de células viáveis, verificado imediatamente antes da diluição, entre as culturas expostas ao agente antimicrobiano e as culturas controlo.

Os valores negativos indicam que o crescimento na cultura tratada com o agente antimicrobiano se faz mais rapidamente que na cultura controlo.

Todos os valores de PAE obtidos com a vancomicina se mostraram negativos, variando desde -0.37h a -0.73h. Não se verificou nenhuma diferença significativa nos valores de PAE quando, para 1h de exposição, a concentração da vancomicina aumentou de 5x para 30x CIM (-0.37 para -0.73; $p>0.05$). O aumento da exposição de 1h para 2h também não aumentou de modo significativo os valores de PAE quando estudadas as concentrações de 5x e 10x CIM.

Os PAEs induzidos pelo metronidazol variaram de -0.02h a +2.5h. A duração do PAE apareceu como uma função directa da concentração de metronidazol, verificando-se um aumento significativo nos valores de PAE quando, para 1h de exposição, a concentração variou de 5x para 10x (0.02 para 0.57; $p < 0.01$) e de 10x para 40x CIM (0.57 para 2.50; $p < 0.05$). O aumento da exposição de 1h para 2h não influenciou significativamente os valores de PAE do metronidazol, nas concentrações de 5x CIM (-0.02 para -0.18; $p > 0.05$) e 10x CIM (0.57 para 0.87; $p > 0.05$).

2.4.2.2. Em várias estirpes clínicas

Tentámos verificar se valores negativos seriam também obtidos quando determinássemos o PAE da vancomicina noutras estirpes de *C. difficile*. Escolhemos para o efeito três estirpes isoladas de fezes de crianças, duas das quais produtoras de toxina A (CD1 e CD89) e uma não produtora (CD22). Apenas a estirpe CD89 apresentou maior sensibilidade à vancomicina, comparativamente às estirpes CD1 e CD22 que registaram valores de CIM idênticos à estirpe ATCC 9689.

No Quadro IV estão registados os valores de PAE das várias concentrações de vancomicina nas três estirpes clínicas de *C. difficile*, após um período de exposição de 1h e 2h.

À semelhança da estirpe ATCC 9689 todos os valores de PAE obtidos com as várias concentrações supra-inibitórias de vancomicina se mostraram negativos indicando, que as três estirpes, exibem um crescimento mais rápido após exposição a este antibiótico que na ausência deste. Não se verificou nenhuma diferença significativa na duração do PAE com o aumento da concentração da vancomicina nem com o aumento da exposição ao antibiótico.

Quadro IV. PAEs de concentrações supra-inibitórias de vancomicina em três estirpes clínicas de *C. difficile* , após período de exposição de 1h e 2h.

Estirpe designação	Vancomicina			
	CIM (mg/L)	Concentração (mg/L)	Tempo exposição(h)	PAE ^a (h)
CD1 (Tox A+)	0.75	3.75 (5xCIM)	1	-0.40
			2	-0.30
		7.5 (10xCIM)	1	-0.80
			2	-0.85
		22.5 (30xCIM)	1	-0.60
CD22 (Tox A-)	0.75	3.75 (5xCIM)	1	-0.25
			2	-0.50
		7.5 (10xCIM)	1	-0.25
			2	-0.50
		22.5 (30xCIM)	1	-0.55
CD89 (Tox A+)	0.50	3.75 (7.5xCIM)	1	-0.40
			2	-0.65
		7.5 (15xCIM)	1	-0.55
			2	-0.55
		22.5 (45xCIM)	1	-0.40

^a Os valores representam a média de duas determinações

Tox A+ = estirpe produtora de toxina A

Tox A- = estirpe não produtora de toxina A

Discussão

Estudo ultraestrutural e fisiológico de *C. difficile*

Parede celular e S-layer de *C. difficile*

A parede celular típica de bactérias Gram positivo, observada por microscopia electrónica de transmissão, exhibe uma monocamada amorfa, contínua, osmiofílica, com uma espessura normalmente compreendida entre os 20 e os 50 nm (Beveridge, 1981; Shockman & Barrett, 1983). As células vegetativas das estirpes de *C. difficile* usadas neste estudo revelaram uma parede celular complexa, com uma camada osmiofílica típica de bactérias Gram positivo, com uma espessura média de 19.6 ± 3.5 nm e com uma estrutura de superfície (S-layer) com cerca de 17.5 ± 3.4 nm. Esta camada de superfície exhibe uma menor densidade aos electrões do que a matriz de peptidoglicano. Foi Kawata *et al.* (1984) que descreveram pela primeira vez a S-layer na parede celular de *C. difficile*. Esta estrutura não é exclusiva de *C. difficile* e tem sido também descrita noutras espécies bacterianas, incluindo *Archaeobacterias* e *Eubacterias* Gram-positivo e Gram-negativo (Beveridge & Graham, 1991; Sleytr & Messner, 1988). Estas estruturas regulares periódicas, hoje vulgarmente denominadas por S-layers, constituem o componente celular mais externo de um grande número de bactérias Gram-positivo das quais se destacam os géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* e *Sporosarcina* (Messner & Sleytr, 1992; Sleytr & Messner, 1983; Sousa *et al.*, 1976).

As S-layers são formadas pela reunião de sub-unidades proteicas ou glicoproteicas, idênticas, que se repetem de modo regular e periódico, apresentando um rearranjo com simetria oblíqua, tetragonal ou hexagonal (Beveridge & Graham, 1991; Messner & Sleytr, 1992; Sleytr & Messner, 1988). Esta simetria parece ser determinada exclusivamente pelas características das sub-unidades e não pelas propriedades da camada subjacente (Sleytr & Glauert, 1975). A S-layer de *C. difficile* foi já caracterizada, sabendo-se que exhibe um rearranjo regular tetragonal e é constituída pela repetição, não de uma, mas de duas sub-unidades proteicas diferentes (Hagiya *et al.*, 1992; Kawata *et al.*, 1984; Masuda *et al.*, 1989;

Takeoka *et al.*, 1991).

A análise electroforética que realizámos sobre o conteúdo proteico da S-layer das várias estirpes de *C. difficile*, revelou o aparecimento de duas bandas, correspondentes às duas sub-unidades proteicas descritas. O peso molecular destas duas proteínas, estimado por SDS-PAGE, variou ligeiramente entre as várias estirpes. Alguns autores (Kawata *et al.*, 1984) têm dividido as estirpes de *C. difficile* em dois grupos, com base no peso molecular exibido pelas duas proteínas da S-layer em SDS-PAGE: o grupo 1, contendo proteínas com 45-47kDa e 32kDa e o grupo 2, contendo proteínas com 42kDa e 38kDa. No nosso estudo, foi possível, no entanto, agrupar as estirpes de *C. difficile* em três grupos: um primeiro grupo contendo proteínas com 48-50kDa e 34-35kDa, um segundo grupo contendo proteínas com 46kDa e 41kDa, e por último um grupo contendo proteínas com 41kDa e 34kDa. Embora os valores dos pesos moleculares por nós encontrados se tenham mostrado superiores aos descritos, pensamos que os dois primeiros grupos correspondem, respectivamente, ao grupo 1 e 2 de Kawata *et al.* (1984), dada a semelhança que se verifica entre os seus perfis electroforéticos. O grupo constituído por proteínas com 41kDa e 34kDa parece nunca ter sido descrito. A heterogeneidade de pesos moleculares exibida por estas duas proteínas parece não ser uma situação única, já que estudos comparativos de distribuição e uniformidade das S-layers têm demonstrado que diferentes estirpes de uma determinada espécie podem exibir uma variabilidade marcante no que respeita à estrutura e composição da S-layer, assemelhando-se esta diversidade ao carácter não conservativo de outros componentes superficiais bacterianos tais como exopolissacáridos ou lipopolissacáridos (Messner & Sleytr, 1992). Nas estirpes estudadas, não foi encontrada nenhuma correlação entre o perfil electroforético das duas proteínas da S-layer e a capacidade de produção de toxina A, tendo as estirpes toxígenas apresentado perfis idênticos ao de estirpes não toxígenas, facto já demonstrado por Kawata *et al.* (1984).

As características descritas para a S-layer de *C. difficile* diferem das da maior parte das S-layers de outras espécies bacterianas conhecidas, as quais são constituídas apenas por uma única espécie proteica (ou glicoproteica) cujo peso molecular é regra geral superior ao

descrito, situando-se normalmente entre os 40kDa e os 200kDa (Messner & Sleytr, 1992). Em *C. botulinum* e *C. tetani*, por exemplo, foram identificadas S-layers constituídas por uma única proteína com peso molecular de 150kDa e 140kDa, respectivamente (Takumi *et al.*, 1983; Takumi *et al.*, 1991).

Não tem sido possível detectar a presença de porções glicosiladas a nível das proteínas da S-layer de *C. difficile*. A marcação das proteínas 32K e 45K pelo ácido periódico de Schiff após SDS-PAGE mostrou-se incapaz de revelar a presença de carboidratos (Kawata *et al.*, 1984). Tentámos no nosso trabalho evidenciar a presença de polissacarídeos a nível da S-layer através da detecção ultraestrutural de componentes PAS-positivos pela técnica de Thiéry (Thiéry, 1967). Esta técnica, que se baseia na conversão dos grupos glicol dos polissacáridos em grupos aldeído através da oxidação pelo ácido periódico com posterior revelação pela prata após reacção com a tiosemicarbazida, também não conseguiu evidenciar a presença de carboidratos a este nível. Até há pouco a presença de glicoproteínas a nível das S-layers parecia ser um exclusivo das *Archaeobacterias*, mas a detecção de pequenos glicosubstituintes em *B. stearothermophilus*, *C. thermohidrosulfuricum*, *C. thermosaccharolyticum* e *C. symbiosium* (Beveridge & Graham, 1991; Messner *et al.*, 1990; Sleytr & Thorne, 1976), embora representando apenas uma pequena percentagem da massa total da glicoproteína, tem levado a especular que a reanálise química das S-layers proteicas, por técnicas mais sensíveis, como a separação hidrolítica da proteína e análise por ressonância magnética nuclear (Messner *et al.*, 1990) possa vir a evidenciar porções glicosiladas até então não detectáveis pelas técnicas convencionais (Sleytr & Messner, 1983).

Durante todo o período em que decorreu o nosso estudo, a S-layer esteve sempre presente cobrindo completa e integralmente a superfície bacteriana, embora excluída do septo parietal de divisão celular. Nem mesmo após 8 meses de cultura em laboratório, perfazendo um total de 80 passagens, a S-layer de *C. difficile* deixou de ser visualizada. Tal dado está em desacordo com as observações de alguns autores que afirmam que, à semelhança do que se passa com outras estruturas superficiais bacterianas, o crescimento contínuo *in vitro* leva

frequentemente ao desaparecimento destas estruturas superficiais (Messner & Sleytr, 1992). As sub-unidades das S-layers estão geralmente ligadas entre si e à parede celular subjacente através de um conjunto de forças fracas, que se estabelecem entre os grupos amino e os grupos carboxilo das proteínas, tais como pontes de hidrogénio, ligações iónicas (envolvendo catiões divalentes ou a interacção directa de grupos polares) e interacções hidrofóbicas, verificando-se ser as forças entre as sub-unidades mais fortes que as forças que ligam a S-layer à parede celular (Sleytr, 1976; Sleytr & Glauert, 1975; Sleytr & Messner, 1983). A integridade estrutural de certas S-layers necessita por vezes da presença de catiões divalentes (Smit *et al.*, 1992; Tsuboi *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1992). Consequentemente para a remoção das S-layers são normalmente suficientes processos de extracção relativamente suaves tais como, alterações do pH ou da força iónica do meio, tratamento com agentes quelantes, agentes caotrópicos ou detergentes não iónicos (Sleytr & Messner, 1983; Sleytr & Messner, 1988).

No nosso estudo para a remoção da S-layer de *C. difficile* procedemos previamente à desintegração mecânica das células, tendo-se seguido uma centrifugação diferencial afim de separar os fragmentos de parede celular. Foram usadas para este efeito células na fase inicial do crescimento logarítmico, dado que autolisam mais rapidamente comparativamente às células do final desta fase ou da fase estacionária (Kawata *et al.*, 1984). Devido ao facto de nas bactérias Gram-positivo os fragmentos de parede celular se encontrarem frequentemente contaminados com membranas plasmáticas e material proteico solúvel, houve necessidade de remover estes contaminantes através da lavagem com uma solução salina concentrada (ex: NaCl 1M) à qual se seguiu o tratamento pelo detergente não iónico Triton X-100 (Kawata *et al.*, 1984; Sleytr & Messner, 1983). Para alguns autores este tipo de tratamento não é o mais aconselhável quando se pretende preservar intacta a S-layer de *C. difficile*, preferindo a extracção a partir da célula intacta (Hagiya *et al.*, 1992). O destaque da S-layer foi finalmente conseguido pelo tratamento com ureia 6M.

Quando procedemos à observação de cortes ultrafinos de paredes celulares isoladas, obtidas após desintegração celular e remoção da membrana citoplasmática, verificou-se a presença de

uma camada adicional semelhante à S-layer do lado interior da camada de peptidoglicano. Esta capacidade da S-layer em se justapôr a ambos os lados da camada de mureína tem sido observado em outras bactérias Gram-positivo (Masuda & Kawata, 1981; Sleytr & Glauert, 1976; Sousa *et al.*, 1976). Esta capacidade de auto-reunião, na presença ou ausência de superfícies adequadas à sua adesão é comum a todas as sub-unidades das S-layers (Messner & Sleytr, 1992; Pum *et al.*, 1993; Sleytr, 1976; Sleytr & Messner, 1983), parecendo desempenhar a carga nativa destas sub-unidades um papel crucial não só na manutenção da integridade estrutural da S-layer como também na reunião das sub-unidades isoladas (Sára & Sleytr, 1987.a.).

Não foi ainda atribuída qualquer função biológica à S-layer de *C. difficile*, mas trabalhos recentes demonstram que para uma fagocitose eficaz pelos polimorfonucleares é necessária a opsonização da bactéria pelo complemento ou por anticorpos específicos (Dailey *et al.*, 1987), o que poderá indicar a presença de um factor anti-fagocítico no *C. difficile*. Curioso é também o facto de, na colite pseudomembranosa, a infiltração característica dos polimorfonucleares não ter grande efeito na eliminação desta bactéria (Borriello *et al.*, 1990). Desconhece-se a identidade deste determinante anti-fagocítico, não parecendo a produção de toxinas ter qualquer responsabilidade neste fenómeno, pois ele é comum a estirpes tóxicas e não tóxicas (Dailey *et al.*, 1987). Tem sido demonstrado que algumas S-layers podem funcionar como verdadeiros factores de virulência, ao tornar as bactérias refractárias à ingestão pelos macrófagos (McCoy *et al.*, 1975) ou ao protegê-las contra a actividade bactericida do complemento (Munn *et al.*, 1982).

Membrana citoplasmática de *C. difficile*

Constituída por uma bicamada fosfolipídica onde se inserem proteínas integrais e se associam proteínas periféricas de acordo com o modelo de Singer & Nicolson (1972), a membrana citoplasmática constitui a principal barreira de permeabilidade entre a célula e o meio ambiente estando envolvida em numerosos fenómenos biológicos de vital importância

para a bactéria (Rogers *et al.*, 1980). A sua observação por microscopia electrónica de transmissão, pela técnica dos cortes ultrafinos, revela um perfil trilaminar, constituído por duas camadas densas aos electrões, separadas por uma camada central não electronodensa. Este perfil reflecte a organização molecular da membrana citoplasmática e é o resultado da deposição dos átomos electronodensos nos componentes da membrana, correspondendo as duas camadas electronodensas às zonas hidrofílicas, constituídas pelos grupos polares das proteínas integrais, proteínas periféricas e grupos polares dos fosfolípidos e a camada não electronodensa à zona hidrofóbica, constituída pelas cadeias dos ácidos gordos dos fosfolípidos e zonas hidrofóbicas das proteínas integrais (Silva, 1979). Enquanto que as bactérias Gram-negativo exibem em geral membranas citoplasmáticas com um perfil simétrico a ultraestrutura das membranas de bactérias Gram-positivo exhibe um perfil assimétrico com o folheto exterior mais espesso e denso que o folheto interno (Silva, 1979, 1984). Embora tratando-se de um bacilo Gram-positivo a estrutura trilaminar assimétrica da membrana citoplasmática de *C. difficile* nem sempre é evidente, sendo a sua visualização dependente das condições de fixação. Nos casos em que se consegue uma boa preservação da membrana citoplasmática, o folheto externo, subjacente à parede celular, apresenta-se espesso e bastante electronodenso, enquanto que o folheto interno aparece com uma densidade aos electrões muito reduzida, dificultando a visualização da estrutura tripla assimétrica da membrana.

A assimetria da membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivo é sempre acompanhada de um comportamento diferente, por parte dos dois folhetos, frente à marcação de carboidratos pelo método de Thiéry (Thiéry, 1967), apresentando o folheto externo normalmente componentes PAS-positivos enquanto que o folheto interno reage sempre negativamente (Silva, 1984). A alteração do perfil assimétrico da membrana citoplasmática para simétrico, representa normalmente um marcador precoce de distúrbio na membrana citoplasmática e significa alteração da sua organização molecular (Silva, 1979; Silva, 1984). Bactérias Gram-positivo em lise (Silva, 1979) ou expostas a agentes membranoactivos, tais como calor húmido (Silva & Sousa, 1972), anestésicos locais (Silva *et al.*, 1979),

feniletilálcool (Silva *et al.*, 1976.a.) solventes orgânicos (Silva *et al.*, 1978) apresentam um perfil simétrico verificando-se simultaneamente um aumento da densidade electrónica do folheto interno. A passagem para um perfil simétrico é sempre acompanhada de uma ausência de reacção do folheto externo, indicando que os componentes PAS-positivo, que se encontram assimétricamente localizados, perdem-se quando as membranas se alteram (Silva, 1984). Os iões cálcio mostram-se necessários à preservação dos componentes PAS-positivo deixando estes de ser visualizados em processos de fixação deficitários neste ião (Silva, 1984).

A base molecular da assimetria ultraestrutural parece estar na presença de moléculas anfífilas apenas na camada externa da membrana citoplasmática, as quais parecem também perder-se em situações em que há lesão da membrana (Silva, 1984). Estes anfífilos possuem resíduos de açúcar na porção hidrofílica da molécula (Wicken & Knox, 1980) sendo possível que estes carboidratos sejam responsáveis pela coloração de Thiéry (Silva, 1984). Os ácidos lipoteicoicos, que constituem a principal molécula anfífilica das bactérias Gram-positivo (Huff, 1982), são apontados como potenciais responsáveis pela assimetria ultraestrutural destas membranas (Silva, 1984). Algumas das suas características como, a elevada afinidade para os catiões divalentes (Hughes *et al.*, 1973), a fácil libertação das membranas durante a lise dos Gram-positivos (Horne & Tomasz, 1979) e a importância do cálcio nessa libertação (Wicken & Knox, 1975), estão de acordo com uma tal função. Em *C. difficile* foi já identificado um polímero análogo dos ácidos lipoteicoicos, a nível da membrana citoplasmática, o qual é facilmente libertado após tratamento com o agente quelante EDTA em consequência da perda da integridade da membrana (Poxton & Cartmill, 1982). Embora não seja um ácido lipoteicoico típico, não contém ribitol nem glicerol fosfato, trata-se no entanto de um lipocarbohidrato fosforilado embora com uma composição mais complexa da que tem sido descrita para este tipo de moléculas (Poxton & Cartmill, 1982). Esta poderá ser em *C. difficile* a molécula anfífilica responsável pela assimetria da membrana citoplasmática. A ausência de moléculas ricas em grupos 1,2-glicol como o glicerol e o ribitol, grupos dos quais depende o resultado da coloração PAS, poderá talvez explicar o

facto de, no nosso estudo, apenas exposições à tiosemicarbazida superiores a 28h terem sido capazes de revelar componentes PAS-positivos quando as células de *C. difficile* foram submetidas à técnica de Thiéry.

Influência das condições de fixação na ultraestrutura de *C. difficile*

Ao longo do nosso trabalho foram usados basicamente dois processos de fixação, designados por GAFACA/OsO₄ e OsO₄/GAFACA. Ambos os processos envolveram uma fixação principal pelos aldeídos e pelo tetróxido de ósmio e uma pós-fixação pelo acetato de uranilo. Importante será salientar que o ião Ca²⁺ esteve sempre presente durante a fixação principal, já que ele se mostra essencial para a estabilização e preservação das membranas e ribossomas (Silva, 1975). A diferença entre os dois processos residiu apenas nos fixadores primário e secundário usados durante a fixação principal. No processo designado por GAFACA/OsO₄ os aldeídos funcionaram como fixador primário e o OsO₄ como fixador secundário, enquanto que no processo OsO₄/GAFACA esta ordem foi invertida funcionando agora o OsO₄ como primeiro fixador. Esta fixação dupla pelos aldeídos e pelo OsO₄ é o processo que melhores resultados oferece na preservação das várias estruturas celulares (Hayat, 1981). O glutaraldeído apresenta uma grande capacidade estabilizadora de proteínas ao formar com estas "cross-links" intra e inter-moleculares (Hayat, 1981). A mistura formada pelo glutaraldeído e formaldeído, é hoje no entanto mais vulgarmente usada, dada a vantagem que apresenta de penetrar na amostra mais rapidamente levando conseqüentemente a uma melhor preservação do material proteico (Hayat, 1981). Dada a limitação dos aldeídos na fixação dos lípidos, torna-se indispensável a fixação sequencial pelo OsO₄ (Hayat, 1981). A preservação dos componentes lipídicos é conseguida eficazmente pelo OsO₄, que sendo um metal pesado provoca simultaneamente um aumento na densidade electrónica destes componentes (Hayat, 1981). A pós-fixação pelo acetato de uranilo, antes da desidratação da amostra, mostra-se essencial dada a sua acção estabilizadora em relação às membranas bacterianas e ao DNA, à qual se adiciona também um efeito contrastante (Silva, 1979).

Dado que o *C. difficile* é uma bactéria anaeróbia estrita, tentou-se sempre que possível, que o início da fixação se realizasse em condições de total anaerobiose, tendo-se conseguido tal objectivo em bactérias crescendo à superfície de meios sólidos e em bactérias provenientes de culturas líquidas previamente fixadas em caldo. Nas culturas líquidas onde esta pré-fixação não se realizou, as bactérias permaneceram algum tempo em condições de aerobiose, dado que o fixador primário foi apenas adicionado após a sua centrifugação. Um dos nossos objectivos foi estudar de que modo as condições de fixação descritas influenciariam a ultraestrutura das formas vegetativas de *C. difficile*, provenientes quer de meio líquido quer de meio sólido.

A preservação da membrana citoplasmática dos Gram-positivos está muito dependente das condições de fixação sendo o perfil assimétrico sómente visível quando se realiza uma fixação pelos aldeídos-OsO₄ na presença de Ca²⁺ e a esta se segue uma pós-fixação com o uranilo (Silva, 1975, 1984). Na ausência de cálcio a membrana citoplasmática dos Gram-positivos aparece simétrica demonstrando o papel estabilizador deste ião em relação a esta estrutura (Silva, 1984). Referimos atrás que a estrutura trilaminar assimétrica da membrana citoplasmática de *C. difficile* nem sempre foi bem evidente, embora em todos os processos de fixação, por nós utilizados, tivessem estado presentes as condições descritas para uma boa preservação da ultraestrutura da membrana bacteriana, nomeadamente a presença do ião Ca²⁺ durante a fixação principal (ambos os fixadores continham 10 mM de CaCl₂) e a pós-fixação pelo uranilo. Apenas as células que sofreram uma fixação primária pelos aldeídos em condições de total anaerobiose exibiram uma membrana citoplasmática com perfil assimétrico, embora, como dissemos este perfil se tivesse apresentado pouco nítido devido à reduzida electronodensidade apresentada pelo folheto interno que dificultou a visualização da estrutura trilaminar. Células provenientes de meio líquido submetidas à fixação primária pelos aldeídos mas sem prévia fixação em caldo apresentaram, no entanto, uma fraca preservação da membrana. A única diferença relativamente às anteriores é que estas células, fixadas sómente após centrifugação, permaneceram algum tempo em condições de aerobiose antes do fixador tornar efectiva a sua capacidade estabilizadora. Tal facto sugere que um

início de fixação em condições de total anaerobiose pode ser importante para a boa preservação da membrana citoplasmática deste bacilo anaeróbio estrito. Todas as células submetidas à fixação primária pelo OsO₄, quer em aero ou anaerobiose, apresentaram uma fraca preservação da membrana citoplasmática, evidenciada pela sua solubilização em certos locais e pela passagem do seu perfil assimétrico para simétrico. Apesar da acção estabilizadora do OsO₄ relativamente à maior parte dos lípidos, o seu uso como fixador primário tem mostrado provocar a descontinuidade dos sistemas membranosos (Hayat, 1981). Embora não seja ainda conhecido o mecanismo exacto da fractura das membranas plasmáticas, é possível que o OsO₄ ao desnaturar as proteínas superficiais crie uma instabilidade física nas membranas (Hayat, 1981). Uma boa preservação das membranas plasmáticas é, pelo contrário, conseguida quando a fixação primária é realizada pelo glutaraldeído (Hayat, 1981). O tratamento secundário pelo OsO₄ é no entanto indispensável já que, na sua ausência, a maior parte dos lípidos é completamente extraída durante a desidratação da amostra (Hayat, 1981). Tudo isto poderá explicar o facto da fixação GAFACA/OsO₄ ter sido o processo que, no nosso caso, melhor preservou a membrana citoplasmática de *C. difficile*.

Detectámos ao longo do nosso trabalho, especialmente associado às condições de fixação, o aparecimento de mesossomas. Estas estruturas membranosas mais ou menos complexas formadas pela invaginação da membrana citoplasmática constituem, para alguns autores (Silva *et al.*, 1976.b.; Silva, 1979), artefactos membranosos produzidos pela acção agressora dos fixadores em bactérias Gram-positivo. É hoje aceite que a configuração, número e localização dos mesossomas depende das condições de fixação (Hayat, 1981). No nosso caso foram visualizados mesossomas sempre que as células tiveram como fixador primário o OsO₄, tendo-se verificado diferenças consideráveis no seu número, tamanho e complexidade com as diferentes condições de fixação. Eles mostraram-se muito abundantes e volumosos nas células provenientes de culturas líquidas pré-fixadas em caldo, em que o OsO₄, em consequência da diluição imposta pela técnica, esteve presente na concentração final de 0.2%. Mesossomas mais pequenos e em número mais reduzido foram detectados em

células não submetidas à pré-fixação em caldo, expostas à concentração de 1 % de OsO₄. O aparecimento de mesossomas foi raro em células provenientes de meios sólidos. Submetidas igualmente à acção fixadora de 1% de OsO₄ estas células não sofreram, como as anteriores, uma exposição ao ar antes da adição do fixador. Não sabemos até que ponto a exposição ao ar deste bacilo anaeróbio estrito pode ser responsável por este tipo de alteração das membranas. Relativamente às células fixadas primariamente pelos aldeídos, só muito raramente foram observados mesossomas. Os nossos resultados estão de acordo com a teoria de Silva *et al.* (1976.b.) de que os mesossomas são o resultado da acção agressora, sobre as membranas bacterianas, de uma baixa concentração de OsO₄ e que o aparecimento de mesossomas volumosos e complexos está íntimamente associado a uma fixação pouco eficaz, como a do OsO₄ a 0.1%, verificando-se uma diminuição do tamanho e complexidade com fixadores mais eficientes, nomeadamente OsO₄ a 1%. Para estes autores o mecanismo de formação dos mesossomas parece estar relacionado não só com as características deste fixador, o qual afecta a zona hidrofóbica das membranas antes de tornar efectiva a sua capacidade estabilizadora, como também com a elevada pressão osmótica interna (20-30 atmosferas) apresentada pelas bactérias Gram-positivo.

Vimos atrás que a observação ultraestrutural de células de *C. difficile* revelou, a nível da parede celular, a existência de duas camadas electronodensas, uma situada imediatamente acima da membrana citoplasmática, correspondente à matriz do peptidoglicano e outra mais superficial, apresentando uma menor densidade aos electrões, correspondente à S-layer. A diferença de densidade electrónica apresentada por estas duas camadas, visualizada mesmo em fragmentos de parede celular, apareceu associada aos dois processos de fixação, tendo-se obtido geralmente um melhor contraste nas células fixadas primariamente pelo OsO₄. A diferença de electronegatividade reflecte diferenças na capacidade de ligação destas duas estruturas aos átomos com número atómico elevado utilizados no contraste das amostras e pressupõe a existência de diferenças na respectiva composição química (Silva, 1979). No nosso caso esse contraste foi conseguido á custa do acetato de uranilo e do citrato de chumbo, metais pesados que se ligam de modo não específico aos grupos aniónicos (Hayat,

1975). A S-layer apresenta na realidade uma estrutura relativamente simples quando comparada com o peptidoglicano. Constituída, como vimos, pela repetição de sub-unidades proteicas onde predominam aminoácidos acídicos e hidrofóbicos, a densidade electrónica que exhibe quando visualizada por microscopia electrónica de transmissão, poderá ficar a dever-se à carga electronegativa dos aminoácidos acídicos a qual possibilitará a ligação da S-layer ao UO_2^{2+} e ao Pb^{2+} . O peptidoglicano, por seu lado, aparece nos Gram-positivos como um heteropolímero complexo constituído por cadeias polissacarídicas paralelas (formadas pela repetição alternada de dois açúcares aminados, a N-acetil-D-glucosamina e o ácido N-acetilmurâmico), ligadas entre si através de curtas cadeias interpeptídicas transversais e às quais se encontram ainda associados um certo número de polímeros secundários, tais como ácidos teicóicos, ácidos teicurónicos e/ou outros polissacáridos acídicos ou neutros, através de ligações covalentes (Rogers *et al.*, 1980; Shockman & Barrett, 1983; Ward, 1981). Sabe-se que em *C. difficile* o polímero secundário mais abundante da parede celular é também um carbohidrato fosfatado embora sem características de ácido teicóico típico (Poxton & Cartmill, 1982). A parede celular oferece pois um elevado número de potenciais locais aniónicos tais como os grupos fosfodiéster dos ácidos teicoicos, os grupos carboxilo livres do peptidoglicano, os grupos hidroxilo dos açúcares e os grupos amida das cadeias peptídicas (Beveridge & Murray, 1976). No entanto, parece dever-se principalmente aos grupos fosfato dos ácidos teicoicos e aos grupos carboxilo dos muramil-peptidos a carga aniónica da parede celular dos Gram-positivos (Beveridge & Murray, 1980; Graham & Beveridge, 1994; Sonnenfeld *et al.*, 1985). A existência de um maior número de grupos reactivos a nível desta estrutura, comparativamente à S-layer, poderá explicar a diferença de contraste entre as duas camadas.

O aspecto ultraestrutural da S-layer pareceu-nos também variar com as condições de fixação, nomeadamente com o tipo de fixador primário utilizado na fixação principal. Tendo aparecido com um aspecto ondulado em células fixadas primariamente pelos aldeídos tomou uma forma rectilínea em células fixadas inicialmente pelo OsO_4 . A explicação para tal facto poderá estar na conversão das cargas nativas dos protómeros. É sabido que os grupos

carboxilo carregados negativamente expostos na superfície interna da S-layer, estão envolvidos na formação de pontes salinas entre esta estrutura e o peptidoglicano (Pum *et al.*, 1989, Sára & Sleytr, 1987.a., Sára & Sleytr, 1993) e que os grupos carboxilos, quer da superfície interna quer da superfície externa da S-layer, interagem directamente com os grupos amino, sendo as interacções electrostáticas entre estes dois grupos necessárias para a coesão das sub-unidades dentro do rearranjo proteico bi-dimensional (Sára & Sleytr, 1987.a., Sára & Sleytr, 1993). Qualquer tratamento químico que leve à alteração das cargas nativas destes grupos, como a conversão dos grupos amino livres em grupos neutros ou em grupos negativos e a conversão dos grupos carboxilo em grupos neutros, é responsável por uma desestabilização da S-layer (Sára & Sleytr, 1987.a.). O tratamento ácido de fragmentos de paredes celulares de *Clostridium*, por exemplo, mostra-se capaz de converter a estrutura regular periódica da S-layer numa estrutura granulosa devido à protonação dos grupos carboxilo e à consequente perda das interacções electrostáticas necessárias à estabilização da estrutura (Sleytr & Glauert, 1976). Por seu lado o tratamento com glutaraldeído têm mostrado levar ao aparecimento de uma carga negativa na superfície externa da S-layer (a qual apresenta normalmente uma carga neutra) ao que se pensa devido à perda da carga positiva dos grupos amino livres por reacção com este dialdeído e à persistência dos grupos carboxilo livres (Pum *et al.*, 1989). A presença deste excesso de cargas negativas dos grupos carboxilo poderá levar a um aumento das forças repulsivas dentro da cadeia polipeptídica levando consequentemente à desestabilização da estrutura da S-layer. O aspecto ondulado observado em células fixadas primariamente pelos aldeídos poderá reflectir essa desestabilização. Por outro lado este aparecimento da carga negativa na superfície externa da S-layer traduz-se num aumento do número de locais de ligação aos metais pesados usados no contraste das amostras. É também possível que o glutaraldeído introduza novos grupos reactivos nesta estrutura (Hayat, 1981). Tal poderá justificar o aumento da densidade electrónica da S-layer e o contraste pouco evidente que se obteve, nas células fixadas inicialmente pela GAFACA, entre as duas estruturas electrondensas da parede celular.

Ultraestrutura de células de *C.difficile* em fase de declínio e expostas ao ar

Vimos que células de *C.difficile* colhidas em boas condições fisiológicas exibem paredes celulares contínuas, membranas citoplasmáticas com perfil assimétrico e citoplasmas com numerosos ribossomas onde foi por vezes visível um nucleóide central de aspecto fibrillar. Células em lise espontânea, provenientes de culturas em fase de declínio, apresentaram, no entanto, paredes celulares com numerosas fracturas, membranas citoplasmáticas descontínuas com perfil simétrico, ausência de ribossomas e precipitação citoplasmática com formação de densos blocos de material compacto na periferia da célula. Estas alterações ultraestruturais são provavelmente consequência da activação das enzimas autolíticas. Uma vez que a degradação da parede celular, originada pela activação das enzimas do sistema autolítico endógeno, é topologicamente localizada e não generalizada (Rogers *et al.*, 1980), tal poderá explicar a presença de pequenos locais de fractura nas paredes celulares ainda visíveis na superfície bacteriana. Esta degradação da parede pareceu-nos, no entanto, ser mais eficaz em meio líquido, já que células crescendo em meio sólido, apresentaram paredes celulares intactas até mesmo quando envolveram estruturas celulares já totalmente desorganizadas. A degradação da parede celular parece pois ocorrer mais tardiamente que a alteração a nível da membrana citoplasmática. Em células expostas ao ar a parede celular nunca foi visível, o que sugere uma degradação mais rápida relativamente aos casos anteriores. Desconhecemos se a exposição ao ar terá desempenhado algum papel na activação do sistema autolítico deste bacilo anaeróbio estrito, embora tal facto seja de admitir. O aspecto ultraestrutural das membranas das bactérias Gram-positivo altera-se, quando a célula bacteriana entra em autólise, verificando-se a passagem do seu perfil assimétrico para simétrico (Silva, 1979). Também no nosso caso foi este o perfil exibido tanto pelas membranas citoplasmáticas como pelas várias vesículas membranosas intracitoplasmáticas que apareceram nestas células em lise. O aparecimento destes sistemas membranosos pode ser explicado, à semelhança do que se passa quando bactérias Gram-positivos são tratadas com agentes membranoactivos (Silva *et al.*, 1976.a.; Silva e Sousa, 1972), pelo aumento da

permeabilidade da membrana citoplasmática, que permitindo o efluxo de diferentes constituintes celulares leva a uma diminuição da pressão osmótica interna da bactéria e conseqüentemente à descompressão da membrana levando à sua invaginação.

A ausência de ribossomas e DNA no compartimento citoplasmático poderá ser explicada pela saída progressiva dos componentes celulares através das fracturas da membrana citoplasmática e parede celular que acompanha a lise celular.

Protoplastos de *C. difficile*

A parede celular é a estrutura responsável pela protecção mecânica da célula bacteriana contra as forças osmóticas internas e externas e também é responsável pela forma característica da bactéria (Beveridge, 1981). A extraordinária força mecânica apresentada pela parede celular das bactérias Gram-positivo deve-se ao seu principal constituinte, o peptidoglicano, cuja degradação leva à perda da forma original da bactéria dando origem a uma célula esférica rodeada apenas pela membrana citoplasmática, denominado protoplasto, o qual necessita, para se manter metabólicamente activo e viável, de um meio hipertónico afim de compensar a alta pressão osmótica interior face à perda do suporte mecânico exterior (Beveridge, 1981; Rogers *et al*, 1980). A lisozima aparece como uma enzima capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas β (1->4) entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina das cadeias polissacarídicas do peptidoglicano. Assim, quando bactérias Gram-positivo são tratadas por esta enzima muralítica ocorre a digestão deste heteropolímero e a conseqüente desagregação da parede celular levando, em meios de adequada pressão osmótica, à formação de protoplastos. A membrana citoplasmática dos protoplastos apresenta um perfil assimétrico idêntico ao observado nas correspondentes células intactas, perfil esse que muda também para simétrico quando ocorre distúrbio do protoplasto por redução da pressão osmótica do meio em que estão suspensos (Silva, 1979). No nosso caso, a observação de protoplastos íntegros e estáveis permitiu-nos concluir definitivamente acerca do perfil assimétrico da membrana citoplasmática do *C. difficile*.

A osmolaridade da solução não constitui o único factor envolvido na estabilização dos protoplastos verificando-se, por exemplo, para a mesma osmolaridade que os péptidos são mais eficazes que os açúcares e dentro destes os melhores estabilizadores osmóticos são os que apresentam maior peso molecular, sugerindo tal facto um envolvimento das constantes de difusão e forma das moléculas, no processo de estabilização destas formas (Rogers *et al.*, 1980). Por seu lado o estabilizador osmótico não deve ser metabolizado pelos protoplastos, medida essa particularmente importante no caso dos açúcares, os quais poderão levar à produção de ácidos na presença de estirpes fermentadoras (Rogers *et al.*, 1980). A sacarose, um dos açúcares mais vulgarmente utilizados no estabelecimento de gradientes osmóticos, constituiu um bom candidato, no caso específico de *C. difficile*, já que não é fermentado por esta bactéria.

O efeito lítico da lisozima sobre as células intactas é determinado primariamente pelo seu livre acesso à parede celular, nomeadamente às ligações por ela hidrolisadas. A lisozima é uma molécula catiónica cuja adsorção à célula bacteriana é altamente dependente do pH e da força iónica do meio (Chang & Carr, 1971), podendo, devido às suas características básicas, formar complexos com substâncias da superfície da célula carregadas negativamente (Chassy & Giuffrida, 1980). Tem sido demonstrado, em *Bacillaceae*, que a S-layer pode mascarar a carga negativa do peptidoglicano diminuindo a sua capacidade de adsorção a moléculas carregadas positivamente (Sára & Sleytr, 1987.a.). Poder-se-á pensar que, de modo semelhante, a S-layer presente em *C. difficile* provoque uma diminuição na capacidade de ligação do peptidoglicano à lisozima explicando-se assim o facto de ser necessário, para se obterem eficazmente protoplastos de *C. difficile*, uma concentração relativamente elevada desta enzima (1mg/ml) e um tempo de incubação um tanto longo (4-5h), comparativamente a outras bactérias Gram-positivo que produzem normalmente protoplastos na presença de concentrações mais baixas de lisozima (0.2-0.4mg/ml) e ao fim de um menor tempo de incubação (Carvalho, 1987; Silva, 1976.a.; Wyrick & Rogers, 1973). Concentrações desta natureza são normalmente utilizadas na produção de protoplastos de bactérias Gram-negativo (Silva & Sousa, 1973), geralmente consideradas "resistentes" à acção da lisozima devido à

presença da membrana externa que funciona como barreira à sua difusão tornando-se necessário um tratamento prévio com EDTA para se tornarem sensíveis (Noller & Hartsell, 1961). No entanto, concentrações tão diferentes, como 0.2mg/ml e 1mg/ml, têm sido descritas na obtenção de protoplastos de *Clostridium pasteurianum* (Minton & Morris, 1983) e *Clostridium acetobutylicum* (Allcock *et al.*, 1982), respectivamente. Desconhecemos se a presença da S-layer neste último caso será a responsável por tal diferença. Pensamos que é razoável especular sobre um possível papel da S-layer na resistência à lisozima, já que este tem sido demonstrado em várias espécies de eubacterias mesofílicas (Sleytr & Messner, 1983). Na tentativa de demonstrarmos directamente este papel de resistência relativamente à S-layer de *C. difficile* resolvemos utilizar como estabilizador osmótico a ureia a qual, teóricamente, apresentaria também a capacidade de remover a S-layer da parede celular. Não conseguimos, no entanto, obter protoplastos com esta solução osmótica, facto esse que pode ter ficado a dever-se à inactivação da lisozima através da desnaturação produzida pela ureia. Dado tratar-se de uma bactéria anaeróbia estrita não utilizámos, na produção de protoplastos de *C. difficile*, as técnicas habitualmente descritas que incluem lavagem, centrifugação e a ressuspensão final das células na solução osmótica. A produção de protoplastos de *C. difficile* foi investigada pela adição directa de uma cultura em fase de crescimento exponencial a várias soluções osmóticas estabilizadoras, tendo-se mostrado mais eficaz aquela que se apresentou constituída por caldo Schaedler adicionado de sacarose e de glicina. A simples presença deste aminoácido na solução osmótica mostrou aumentar a eficácia da lisozima, aumentando não só o número como a velocidade de formação dos protoplastos. Situação semelhante foi também descrita em *C. acetobutylicum* (Allcock *et al.*, 1982). A glicina ao constituir um inibidor da parede celular, ao que se pensa, devido à sua incorporação na parede celular em lugar dos constituintes normais (Strominger & Birge, 1965), parece tornar a célula mais susceptível à acção da lisozima facilitando a produção de protoplastos. A simples adição de EDTA a este tipo de solução osmótica provocou, no entanto, uma redução significativa no número de protoplastos produzidos assim como uma diminuição do seu tamanho relativo. Vimos atrás que o ião Ca^{2+} desempenha em *C. difficile*

um papel importante na reunião das sub-unidades proteicas da S-layer e na ligação desta estrutura ao peptidoglicano, sendo a sua presença necessária à estabilização e manutenção da estrutura regular periódica (Masuda *et al.*, 1989). A instabilidade criada pela quelatação deste íon pelo EDTA, pode ter levado a alterações da S-layer as quais podem ter dificultado, de algum modo, o acesso da lisozima à parede celular. Por outro lado a pequena dimensão apresentada por estes protoplastos poderá ser explicada pela saída de alguns constituintes intracelulares, em consequência da perda da integridade da membrana citoplasmática, causada pela perda do polímero, análogo dos ácidos lipoteicoicos, presente em *C. difficile*, o qual se sabe ser libertado pelo agente quelante EDTA (Poxton & Cartmill, 1982). O perfil simétrico apresentado pela membrana citoplasmática destes protoplastos vem confirmar esta hipótese.

Curiosamente não conseguimos obter protoplastos quando a solução osmótica foi constituída por tampão Tris-HCl 0.05M, pH 8.0. Também a utilização de tampão fosfato de sódio 0.05M, pH 8.0 deu apenas origem a um pequeno número de protoplastos. Dissemos atrás que a ligação da lisozima às células é controlada pela força iónica do meio em que se encontram suspensas as bactérias, verificando-se uma maior ligação desta enzima à célula bacteriana quanto menor for a força iónica deste. Por outro lado sabe-se que, em *Bacillaceae*, as propriedades de crivo molecular da S-layer são também influenciadas pela força iónica do meio e pelo pH (Sára & Sleytr, 1987.b.). Poder-se-á pensar que em *C. difficile* os íões presentes no tampão fosfato de sódio e Tris-HCl tenham competido com a lisozima na ligação desta molécula catiónica aos grupos da célula carregados negativamente ou que estes tenham de algum modo sido capazes de alterar as condições presentes no interior dos poros da S-layer alterando as suas propriedades de crivo. Apresentando o tampão fosfato maior força iónica que o tampão Tris-HCl, para a mesma molaridade e pH, seria de esperar um resultado contrário ao obtido, ou seja, produção de protoplastos mais eficaz no meio Tris-HCl. Este tampão tem mostrado ser na realidade melhor veículo para a lisozima do que o tampão fosfato na sua acção degradativa sobre a parede celular de certas bactérias (Carvalho, 1987). No nosso caso a explicação para a formação de protoplastos apenas em tampão

fosfato poderá estar na perda da integridade estrutural da S-layer, em consequência da solubilização da sua proteína 32kDa no tampão fosfato (Takumi *et al.*, 1987). Esta proteína parece ser necessária para a integridade da S-layer juntamente com a proteína 45kDa parecendo desempenhar o rearranjo regular por elas formado um papel protector contra agentes fisicoquímicos incluindo as enzimas proteolíticas (Takumi *et al.*, 1987). Da perda desta integridade estrutural da S-layer em tampão fosfato resultaria assim numa menor resistência a esta enzima muralítica .

Esporulação de *C. difficile*

A caracterização ultraestrutural do processo esporulativo de *C. difficile*, mostrou que este se desenrola, em termos gerais, segundo um processo idêntico ao que tem sido descrito noutras espécies de *Clostridium* e *Bacillus* (Bayen *et al.*, 1967; Rousseau *et al.*, 1971a, 1971b; Ryter, 1965; Sousa, 1980). Na realidade o padrão geral de formação do endosporo parece ter sido conservado através dos diferentes géneros bacterianos (Fitz-James & Young, 1969). Os estudos clássicos de microscopia electrónica têm definido, com base no aparecimento dos diferentes componentes do futuro esporo, sete fases morfológicas no processo esporulativo (Ryter, 1965). Se bem que as três primeiras fases se desenvolvam de modo semelhante nos géneros *Clostridium* e *Bacillus* , as fases posteriores, nomeadamente as correspondentes à formação dos invólucros esporais, têm mostrado desenrolar-se de maneira diferente (Bayen *et al.*, 1967; Rousseau *et al.*, 1971a, 1971b; Ryter, 1965; Sousa, 1980).

A esporulação envolve uma divisão assimétrica da célula e uma série de alterações morfológicas que diferem das que ocorrem na célula vegetativa. Esta divisão assimétrica dá origem a duas células filhas, a célula mãe (esporângio) e o pré-esporo, que embora muito diferentes em tamanho apresentam genomas idênticos (Piggot & Coote, 1976; Errington, 1993). A célula mãe é uma célula terminal diferenciada que, depois de contribuir para o desenvolvimento do futuro esporo, entra finalmente em lise. O pré-esporo, por seu lado, é a célula que, depois de sofrer alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas drásticas, irá

dar origem ao esporo maduro. O modo como estas duas células, com genomas idênticos, iniciam os diferentes programas de expressão dos seus genes, constitui o ponto crucial do sucesso da esporulação e a questão mais interessante da esporogénese. Em *B. subtilis*, uma das bactérias em que a esporogénese tem sido melhor estudada, a formação do endosporo requer a expressão de pelo menos 50 locus genéticos, alguns dos quais constituem operões que contêm vários genes essenciais ao processo de esporulação (Errington, 1993). A maior parte destes locus expressam-se só depois de iniciada a esporulação através da expressão sequencial de factores, os factores sigma, os quais controlam a transcrição dos genes num determinado tipo de célula e durante um período relativamente específico (Losick & Stragier, 1992). Para além do factor vegetativo σ^A , existem pelo menos mais cinco factores sigma, designados respectivamente por σ^H , σ^E , σ^F , σ^G e σ^K , que contribuem para a regulação da transcrição da expressão genética durante a esporulação, aos quais se juntam ainda várias proteínas capazes de exercer um control positivo e/ou negativo sobre essa transcrição (Errington, 1993). Os genes vão estar pois sujeitos a múltiplos níveis de controlo tendo-se em cada caso, pelo menos, um nível de regulação envolvendo um "feedback" por parte dos acontecimentos que ocorrem a nível morfológico, ficando assim assegurado o registo permanente da expressão genética com o desenvolvimento morfológico (Errington, 1993).

O início da esporulação é um fenómeno complexo nele intervindo, pelo menos, três tipos de sinais, dependentes nomeadamente de factores nutricionais, da densidade populacional e do ciclo celular (Errington, 1993). É bem conhecido o facto de deficiências nutricionais como as verificadas a nível das fontes de carbono, azoto ou fósforo serem capazes de induzir a esporulação e que, contrariamente, a presença de glucose é capaz de reprimir este processo (Errington, 1993). Desconhece-se o mecanismo pelo qual esta informação é captada pela célula e posteriormente transmitida ao sistema transcripcional, mas a concentração intracelular de GTP representa, provávelmente, a chave efectora deste sinal nutricional (Freese, 1981). Por outro lado, tem sido demonstrada que a esporulação em *B. subtilis* não ocorre eficazmente em células que mantêm uma baixa densidade populacional verificando-se que sómente células vegetativas crescendo com uma densidade relativamente elevada são

capazes de produzir um factor que se mostra essencial a uma esporulação eficaz (Grossman & Losick, 1988). Esta presença de factores envolvidos na estimulação da esporulação tem sido confirmada por outros autores (Waldburger *et al.*, 1993). Por último, sabe-se que a entrada no ciclo de esporulação só pode ocorrer em determinada fase do ciclo da divisão bacteriana (Mandelstam & Higgs, 1974), o que sugere a existência de uma estreita ligação entre o início da esporulação e o ciclo celular.

A fase da formação do filamento axial nuclear, originalmente definida por Ryter (1965) como a fase I do processo esporulativo, não foi visualizado em nenhuma das células de *C. difficile*. Esta ausência do alongamento do material nuclear tem sido descrita noutras espécies de *Clostridium* (Rousseau *et al.*, 1971a, 1971b). Esta alteração morfológica já não é hoje reconhecida como marcador específico de esporulação uma vez que ficou demonstrado que o alongamento do material nuclear não é exclusivo deste processo e que mutantes, cujo processo de esporulação é parado nesta fase, não apresentam tal formação (Piggot & Coote, 1976). Sousa (1980) ao quantificar a presença desta estrutura em estirpes selvagens e em estirpes mutantes de *B. subtilis* chega a idêntica conclusão.

O primeiro sinal evidente de esporulação foi dado em *C. difficile* pelo aparecimento do septo esporulativo. A formação deste septo define a fase II da esporulação (Ryter, 1965). Trata-se de uma forma modificada do septo de divisão celular que desta vez apresenta uma localização polar. Esta septação assimétrica parece ser precedida de uma inibição do septo central vegetativo, desconhecendo-se ainda o mecanismo responsável pela diferente posição destes dois septos (Errington, 1993). Sabe-se que em *B. subtilis* a formação do septo esporulativo requer a intervenção de numerosos genes, tais como *fts A*, *fts Z* (Beall *et al.*, 1988), *div IB* (Harry *et al.*, 1993) e *div IC* (Levin & Losick, 1994), os quais se encontram também envolvidos na divisão normal da célula vegetativa. Em *C. difficile* a formação do septo esporulativo ocorreu de maneira idêntica à descrita noutras espécies de *Clostridium* e *Bacillus* tendo também sido precedida pela formação inicial de protuberâncias parietais (Rousseau, 1971a, 1971b; Ryter, 1965; Sousa, 1980). Foi possível detectar, entre as duas membranas do septo, a existência de material electronodense com uma aparência semelhante

à da camada interna da parede celular. A presença deste material foi já referida em *C. butyricum*, *C. saccharobutyricum* e *C. tyrobutyricum* (Rousseau *et al.*, 1971a, 1971b) e em *B. subtilis* (Sousa, 1980). Para alguns autores esta presença é considerada anormal e responsável pela lise precoce das células em esporulação (Rousseau *et al.*, 1971b), sendo a síntese do material parietal responsável pelo bloqueio da esporulação quando esta acompanha a formação do septo esporulativo (Ryter, 1965). A paragem da síntese do material parietal parece ser condição indispensável para uma correcta formação deste septo (Pitel & Gilvarg, 1970; 1971). Sousa (1980) ao detectar no septo esporulativo de *B. subtilis* material de natureza polissacarídica, sugere que o material electronodense descrito possa conter abundantemente ácido teicóico, teoria essa que estaria de acordo com os estudos que demonstram que durante a formação do septo esporulativo não há síntese de mucopéptido (Pitel & Gilvarg, 1971). No nosso caso evidenciámos também a presença de material de natureza polissacarídica no septo esporulativo de *C. difficile* pela técnica de Thiéry. Estudos recentes têm demonstrado, no entanto, em *B. subtilis* a presença de uma fina camada de peptidoglicano a nível deste septo, a qual aparece como uma continuidade do peptidoglicano da parede celular, sugerindo que a sua síntese constitui parte integral do processo de septação (Illing & Errington, 1991). A sua presença parece ser necessária nesta fase para direccionar a membrana que se está a formar e para assegurar a formação do septo (Dancer, 1979; Freese, 1972), sendo suficiente para o desempenho de tal função apenas uma pequena quantidade de peptidoglicano, já que o septo esporulativo separa compartimentos celulares com osmolaridades semelhantes (Illing & Errington, 1991). Este peptidoglicano sintetizado numa fase precoce da esporulação, ou seja antes da síntese do cortéx, deverá ser depois digerido (Guinand *et al.*, 1974; Illing & Errington, 1991) para que a bactéria possa prosseguir para a fase III, fase correspondente à imersão do pequeno pré-esporo no citoplasma da célula mãe. No nosso estudo a observação ultraestrutural de pré-esporos individualizados revelou a presença de material electronodense justaposto à membrana citoplasmática, o que nos leva a admitir que o peptidoglicano possa também integrar o septo esporulativo. O processo de individualização do pré-esporo é um fenómeno complexo que

relembra a fagocitose nas células eucariotas. As funções requeridas para este processo estão mal caracterizadas mas elas poderão envolver a acção de uma proteína específica capaz de mediar a fusão da membrana (Errington, 1993). Os movimentos da membrana poderão ser guiados pela pressão hidrostática, através da alteração das osmolaridades relativas das duas células, já que o volume total das duas células é fixado pela sua parede celular comum (Errington, 1993). A partir deste momento o cromossoma do pré-esporo e da célula mãe embarcam em diferentes programas de expressão genética, activando diferentes grupos de genes durante o seu desenvolvimento. Assiste-se nesta fase a um aumento substancial da área total da membrana, o que sugere que o processo de imersão do pré-esporo provavelmente necessitará da manutenção ou mesmo do aumento da síntese de fosfolípidos ao mesmo tempo que se verifica uma redução na elongação da parede celular (Errington, 1993).

Após a individualização do pré-esporo seguiu-se em *C. difficile* a formação da parede esporal e o aparecimento das primeiras lamelas da túnica interna. A zona cortical foi começando a definir-se junto da parede esporal ao mesmo tempo que o número de lamelas da túnica interna foi aumentando. Só numa fase posterior, coincidindo com o aparecimento da túnica externa, o córtex adquiriu a sua espessura definitiva. Este aparecimento precoce da túnica interna, precedendo a formação do córtex, parece constituir uma característica comum ao género *Clostridium* (Rousseau *et al.*, 1971a, 1971b, 1971c). Tal facto levou Bayen (1967) a redefinir neste género a fase IV do processo esporulativo como a fase do aparecimento da zona cortical e da túnica interna e a fase V como a fase correspondente à maturação do córtex e aparecimento da túnica externa. Curiosamente a túnica interna de *C. difficile* apresentou-se constituída por 5-8 lamelas. Este tipo de estrutura multilamelar da túnica interna, muito vulgar em espécies do género *Bacillus*, é pouco vulgar em *Clostridium* embora tenha sido também já observada em *C. pectinovorum*, *C. bifermentans* e *C. tyrobutyricum* (Hoeninger *et al.*, 1968; Rousseau *et al.*, 1971b, Yolton *et al.*, 1968). A túnica externa, cuja espessura definitiva foi adquirida na fase VI, revelou-se muito electronodensa e com uma estrutura de aspecto crenado não estratificada. Esta estrutura

deixou de ser visualizada quando submetemos esporos livres ao tratamento com ureia-mercaptoeanol, o que sugere que esta estrutura está provavelmente ligada à túnica interna através de pontes de hidrogénio e pontes dissulfureto. A desorganização verificada igualmente a nível das lamelas da túnica interna pode reflectir a existência entre elas deste tipo de ligações.

A fase VI no *C. difficile* ficou caracterizada pelo amadurecimento de todos os invólucros esporais. Este amadurecimento dificultou o acesso dos fixadores e corantes de microscopia electrónica ao citoplasma esporal originando uma deficiente preservação e coloração da sua estrutura a qual apareceu nesta fase com um aspecto difuso e pouco contrastado.

A lise do esporângio e a libertação do esporo maduro caracterizaram a última fase, a fase VII. Tornou-se a partir deste momento bem visível o exospório, o qual apareceu sob a forma de uma camada simples em forma de saco envolvendo todo o esporo. O seu aspecto lembrou o descrito para o exospório de *C. butyricum* (Rousseau *et al.*, 1971a). À semelhança do que tem sido descrito noutras espécies de *Clostridium* (Rousseau *et al.*, 1971a), o exospório começou a formar-se no citoplasma da célula mãe numa fase precoce da esporulação, nomeadamente no início da fase IV antes do aparecimento da túnica externa, mas a sua visualização só se tornou evidente após a lise do esporângio. O exospório desapareceu quando os esporos livres foram tratados com ureia-mercaptoetanol.

O esporo maduro bacteriano caracteriza-se pela sua grande resistência aos agentes físicos e químicos (Russel, 1990). A aquisição das diversas resistências não é simultânea, surgindo com uma sequência bem definida ao longo do processo esporulativo (Ryter, 1965). Assim em *B. subtilis*, por exemplo, as resistências aos solventes orgânicos aparecem antes do esporo se tornar resistente ao calor (Ryter, 1965). Para Sousa (1980) a resistência dos esporos de *B. subtilis* ao xilol parece estar correlacionada com o aparecimento do cortéx, a resistência ao tolueno coincide com a maturação do cortéx e com a formação da túnica interna e a resistência ao octanol e clorofórmio surge com a formação da túnica externa. A resistência à lisozima aparece também como uma função das túnicas esporais (Jenkinson, 1981). Embora não sejam conhecidos os mecanismos que levam ao aparecimento das

resistências nas células em esporulação, admite-se no caso dos solventes orgânicos que estas estejam relacionadas com o desenvolvimento das túnicas que impedirão a penetração destes compostos no pré-esporo (Milhaud & Balassa, 1973). Constituídas pelo menos por 15 proteínas diferentes, que se depositam em camadas concêntricas na face exterior da membrana externa do pré-esporo, segundo uma determinada ordem que não corresponde totalmente à ordem da sua síntese (Jenkinson *et al.*, 1981), as túnicas parecem desempenhar para além deste papel protector uma função importante na resposta do esporo à germinação (Jenkinson, 1981; Moir, 1981). O cortéx por sua vez é constituído essencialmente por peptidoglicano, diferindo ligeiramente do peptidoglicano da parede celular vegetativa (Warth & Strominger, 1969). A síntese do cortéx parece ser essencialmente uma função da célula mãe já que ocorre na superfície interna da membrana exterior do pré-esporo, local topologicamente equivalente ao da síntese normal da parede celular vegetativa, sendo os precursores da síntese do cortéx presumivelmente os mesmos utilizados na síntese do peptidoglicano da célula vegetativa. (Errington, 1993). Proteínas específicas da esporulação, parecem estar também envolvidas na produção deste peptidoglicano modificado (Errington, 1993). A síntese do cortéx é um processo complicado que envolve vários genes, alguns dos quais parecem ter derivado da duplicação de genes envolvidos na síntese da parede da célula vegetativa, enquanto outros parecem ser bifuncionais estando envolvidos no crescimento e na esporulação através de uma regulação complexa com múltiplos promotores (Errington, 1993). O cortéx tem sido responsabilizado pelo estabelecimento e manutenção do estado de desidratação do pré-esporo responsável em parte pela resistência do esporo maduro ao aquecimento (Errington, 1993). O baixo grau de pontes interpeptídicas apresentado pelo peptidoglicano cortical de *B. subtilis* e *B. megaterium* suporta a teoria de que o volume do cortéx pode sofrer alterações significativas em resposta a modificações de pH ou da força iónica podendo assim desempenhar papel activo na redução do conteúdo de água do esporo durante a esporulação (Popham & Setlow, 1993). O ácido dipicolínico (DPA), substância que aparece exclusivamente durante a esporulação e que se acumula em altas concentrações no endosporo, aparentemente complexado com Ca^{2+} , parece desempenhar também papel

importante na termo-resistência do esporo (Balassa *et al.*, 1979). Embora o DPA se acumule no pré-esporo, a sua síntese parece ocorrer especificamente na célula mãe numa fase relativamente tardia da esporulação, fase V, representando tal sistema um exemplo interessante de cooperação entre duas células diferenciadas (Errington, 1993).

Quanto aos esporos de *C. difficile* sabe-se que a sua resistência ao calor é razoável, encontrando-se, entre as várias estirpes, valores que variam entre 25min e 34min frente a uma temperatura de 100°C (Nakamura *et al.*, 1985). No entanto, 80°C parece ser a temperatura determinante, mostrando-se esta capaz de originar uma perda de 95%-99% da sua viabilidade (Kamiya *et al.*, 1989). Esta resistência ao calor é no entanto relativamente baixa, quando comparada com a dos esporos de *C. perfringens*, cuja inactivação é apenas conseguida com temperaturas superiores a 100°C (Adams, 1973). Extremamente sensíveis à actividade esporicida do glutaraldeído a 2%, são inactivados ao fim de 10 minutos, contrariamente aos esporos do género *Bacillus* cuja inactivação é sómente conseguida ao fim de 2 h (Dyas & Das, 1985). O tratamento com NaOH 0.1N durante 15 min é capaz de reduzir a viabilidade em 99% (Kamiya *et al.*, 1989).

Vancomicina e metronidazol: efeito de concentrações sub e supra-inibitórias na morfologia, ultraestrutura e crescimento de *C. difficile*

O modo como os antibióticos interferem na estrutura e crescimento das bactérias parece depender da sua concentração, sendo as alterações produzidas pelas concentrações sub-inibitórias normalmente diferentes das produzidas pelas concentrações mínimas inibitórias e supra-inibitórias (Lorian, 1986). A presença de concentrações sub-inibitórias tem mostrado alterar a morfologia, a ultraestrutura e a taxa de crescimento bacteriano, assim como a síntese e excreção de enzimas patogênicas (Lorian, 1986; 1993). Bactérias expostas a doses sub-inibitórias vêm mesmo alterada a sua capacidade de aderência a células epiteliais (Tylewska *et al*, 1981; Vosbeck *et al*, 1982) e apresentam maior susceptibilidade ao sistema imunitário, nomeadamente à fagocitose e à morte pelos leucócitos (Lorian, 1986; McDonald *et al.*, 1981; Van der Auwera, 1991).

Procurámos estudar os efeitos provocados por concentrações sub e supra-inibitórias de vancomicina e metronidazol no crescimento, morfologia e ultraestrutura de *C. difficile*. Para isso foi necessário determinar a susceptibilidade desta bactéria à vancomicina e ao metronidazol, afim de se estabelecer as concentrações desejadas destes dois agentes antimicrobianos. Foi utilizado para o efeito o E teste, técnica quantitativa de difusão em agar baseada num gradiente de antibiótico pré-definido, presente num suporte sólido, a qual determina de modo individual a susceptibilidade de uma determinada bactéria a um dado antibiótico (Bolmstrom *et al.*, 1989). Escolhemos o meio Schaedler que tem sido usado com sucesso nos testes convencionais de susceptibilidade aos antibióticos de bactérias anaeróbias (Jokipii & Jokipii, 1987; Stalons *et al*, 1974). Embora este meio contenha um componente redutor (L-cisteína), que antagoniza a actividade das penicilinas sobre *C. difficile*, ele não apresenta nenhum efeito antagonista na actividade da vancomicina e do metronidazol (Markowitz & Williams, 1985). Os valores de CIM obtidos pelo E teste mostraram-se comparáveis aos obtidos pelo método de referência de diluição em agar (Biavasco *et al*, 1991; Pantosti *et al*, 1985; Swanson *et al*, 1991), provando assim que este método, de

simples e fácil execução, pode substituir eficazmente a laboriosa técnica de referência.

A presença da concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina provocou um atraso muito significativo no crescimento de *C. difficile*, enquanto que idêntica concentração de metronidazol apenas afectou o crescimento bacteriano ligeiramente. O estudo da morfologia bacteriana revelou em ambos os casos a formação de células filamentosas. Estes mostraram-se curtos e negativos ao Gram, no caso da vancomicina, e muito longos e positivos ao Gram, no caso do metronidazol. A fragilidade, apresentada pelas células expostas à vancomicina, frente à coloração de Gram, deve reflectir uma alteração da estrutura da parede celular, já que é ela que controla a resposta a esta coloração (Beveridge, 1990). É sabido que a vancomicina pode impedir a reacção de transpeptidação, não permitindo que se estabeleçam, entre as cadeias laterais peptídicas das cadeias polissacarídicas, as pontes interpeptídicas ("cross-linking"), tão importantes para a coesão e rigidez da parede celular (Barna & Williams, 1984; Nagarajan, 1991). A presença de uma parede pouco rígida, nas células expostas à vancomicina, poderá explicar a sua incapacidade de resistir à fase de descoloração e a conseqüente reacção negativa à coloração de Gram.

Curioso foi o facto da filamentação, induzida pelos dois agentes antimicrobianos, ter sido mais evidente quando o crescimento se realizou em meio sólido. Os filamentos pareceram na realidade mais compridos em meio sólido que em meio líquido. Tem sido referido que as condições de crescimento *in vitro* parecem determinar em parte o aspecto morfológico final de bactérias expostas aos antibióticos (Lorian, 1993). Embora o tipo de alteração produzida pelo antibiótico seja idêntica em meio sólido e líquido, a alteração atinge maior magnitude quando o crescimento bacteriano se realiza numa superfície sólida, provavelmente por a morfologia bacteriana ser menos afectada pela pressão osmótica e pelos efeitos mecânicos das correntes de convecção que se fazem sentir em meio líquido (Lorian, 1986; 1993). As alterações visualizadas em meio sólido assemelham-se mais às obtidas *in vivo* onde o microorganismo cresce aderente à superfície de células ou tecidos (Lorian, 1986).

A observação por microscopia electrónica das alterações provocadas em *C. difficile* pelas doses sub-inibitórias de vancomicina, revelou a presença de bacilos alongados com múltiplas

paredes transversais e septos parietais incompletos dispostos de modo caótico pela célula. Ao mesmo tempo detectou-se um espessamento das paredes, transversais e periférica, assim como uma inibição na separação dos septos completos. Estes efeitos mostraram-se mais evidentes em células da fase exponencial, o que está de acordo com o facto da vancomicina ser um inibidor da biossíntese do peptidoglicano e por isso só activo sobre bactérias em crescimento. Células crescendo em meio sólido apresentaram-se também sob a forma de grandes filamentos, mas nestes não foi possível detectar as múltiplas paredes transversais descritas em meio líquido. Os escassos septos de divisão detectados não apresentaram sinais de separação. Podemos concluir que na presença da dose sub-inibitória CIM/2 de vancomicina as células de *C. difficile* continuam a sua alongação, verificando-se, no entanto, uma incapacidade de septação. Se em meio líquido parece haver uma perturbação na síntese do septo parietal, o que explica a multiplicidade dos septos e a disposição anormal dos seus planos de orientação, em meio sólido parece existir mesmo uma inibição do início da formação do septo de divisão. Não parece verificar-se, em nenhum dos casos, inibição do crescimento da parede celular periférica, assistindo-se até mesmo ao seu espessamento. Estas conclusões estão de acordo com a teoria de que o crescimento periférico e a formação das paredes transversais são processos separados (Lorian, 1986). Hoje sabe-se que em *E. coli* estão presentes, pelo menos, dois modos distintos de inserção de novos polímeros de peptidoglicano, que levam respectivamente à alongação e à septação (Nanninga, 1991; Wientjes & Nanninga, 1991). Embora várias proteínas estejam envolvidas directamente na biossíntese do peptidoglicano, as PBPs (Penicillin-Binding-Proteins) desempenham um papel essencial na fase final desta biossíntese (Matsushashi *et al.*, 1990). As PBPs de alto peso molecular, 1A, 1B, 2 e 3 possuem uma actividade enzimática dupla, de transglicosilase e transpeptidase, sendo assim responsáveis pela incorporação do precursor dissacárido-pentapeptídico, (NAcGlc-NAcMur-pentapéptido) na cadeia de peptidoglicano em formação e pela formação das pontes inter-peptídicas ("cross-links") entre as cadeias lineares adjacentes, enquanto que as PBPs de baixo peso molecular, 4, 5 e 6, são DD-carboxipeptidases responsáveis pela remoção do resíduo terminal D-alanina das cadeias laterais pentapeptídicas

(Matsushashi *et al.*, 1990; Wientjes & Nanninga, 1991). À PBP1 parece caber a síntese inicial das novas cadeias de peptidoglicano, que serão usadas depois como "primers" pela PBP2 e pela PBP3 na construção do peptidoglicano durante a elongação e durante a septação (Wientjes & Nanninga, 1991). A inibição das PBPs1A e 1B não impede, no entanto, o início da septação tendo sido sugerido o envolvimento da síntese de um peptidoglicano insensível à penicilina, durante a fase inicial da divisão (Nanninga, 1991). A PBP3 aparece pois como essencial à divisão celular e os antibióticos β -lactâmicos que inibem selectivamente esta enzima impedem a septação celular levando à formação de filamentos (Botta & Park, 1981; Matsushashi *et al.*, 1990; Wientjes & Nanninga, 1991). As alterações descritas para a vancomicina não podem ser explicadas por este mecanismo já que o seu modo de acção é bem distinto dos antibióticos β -lactâmicos. A vancomicina provoca, no entanto, alterações morfológicas e ultraestruturais semelhantes às produzidas pelos antibióticos β -lactâmicos, que são dentro dos agentes antimicrobianos aqueles que provocam as alterações mais dramáticas na estrutura das bactérias (Lorian, 1986). Embora também inibidor da biosíntese do peptidoglicano, a vancomicina deve a sua acção, não à inactivação das PBPs, mas à ligação não covalente da sua molécula ao dipéptido D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica dos precursores do peptidoglicano (Barna & Williams, 1984; Nagarajan, 1991). Desta ligação resulta provavelmente um impedimento estérico que leva à inibição da enzima transglicosilase, responsável pela transferência do precursor dissacárido para o peptidoglicano em crescimento (Reynolds, 1989). Mesmo se ocorrer a síntese de alguma cadeia de glicano, a reacção de transpeptidação será também provavelmente inibida, dado que a porção acil-D-ala-D-ala do precursor encontra-se envolvida por este grande glicopéptido (Reynolds, 1989). Teremos assim inibidas pela vancomicina as duas reacções enzimáticas que completam a síntese do peptidoglicano. Verificámos, no entanto, pela observação ultraestrutural, que esta inibição se faz sentir essencialmente a nível da síntese do septo parietal, já que foi detectado alongamento e espessamento na parede periférica. A acumulação de UDP-NAcMur-pentapéptidos que acompanha a inibição pela vancomicina (Rogers *et al.*, 1980), poderá ter favorecido a actuação da PBP2 e conseqüentemente a

filamentação da bactéria, já que estes precursores parecem ser os aceitadores preferenciais da reacção de transpeptidação, realizada por esta enzima durante, a elongação (Begg *et al.*, 1990). A PBP3 utiliza, durante a septação, preferencialmente UDP-NAcMur-tripéptidos (Begg *et al.*, 1990; Pisabarro *et al.*, 1986).

À vancomicina têm sido ainda atribuídos outros efeitos como, a inibição da síntese do RNA e a indução de alterações de permeabilidade na membrana citoplasmática (Jordan, 1965; Jordan & Innis, 1959). Nenhum destes efeitos ocorre, no entanto, tão depressa como a inibição da síntese do peptidoglicano e por essa razão têm sido considerados efeitos secundários (Rogers *et al.*, 1980). Este efeito na membrana citoplasmática poderá talvez explicar o facto de não ter sido possível, neste estudo, obter protoplastos com células previamente expostas a concentrações sub-inibitórias de vancomicina.

O estudo ultraestrutural de células expostas a doses sub-inibitórias de metronidazol revelou também a presença de grandes filamentos sem septos de divisão ou com septos completos sem sinal de separação. É difícil explicar este tipo de alteração para um composto sem acção na síntese do peptidoglicano. O mecanismo de acção do metronidazol não é claramente conhecido, mas pensa-se que este envolva a sua redução pelas nitroreductases bacterianas até um intermediário activo que interage com o DNA impedindo a sua replicação (Edwards, 1977; Knight *et al.*, 1978). Importante agente bactericida, com toxicidade selectiva contra uma grande variedade de bactérias anaeróbias (Ralph, 1978; Tally *et al.*, 1978), pouco se sabe, no entanto, acerca dos efeitos produzidos por concentrações baixas de metronidazol nestas bactérias. O aparecimento de filamentos foi também já demonstrado em *Bacteroides fragilis* após exposição a concentrações sub-inibitórias de metronidazol (Calvacanti *et al.*, 1991). Estas concentrações mostraram ainda ser capazes de aumentar a hidrofobicidade da superfície celular de *B. fragilis* (Calvacanti *et al.*, 1991). Alteração semelhante poderá ter ocorrido nas células de *C. difficile* tratadas com metronidazol. Um decréscimo na carga eléctrica da superfície celular explicaria assim o aparecimento do fenómeno de aderência visualizado nestas células.

A exposição de *C. difficile*, desta vez a concentrações supra-inibitórias de vancomicina (5x,

10x e 30x CIM) e metronidazol (5x e 10x CIM), levou também ao aparecimento de grandes filamentos, caracterizados pela ausência de septos de divisão. A inibição da formação deste septo parietal pareceu no entanto reversível, já que após transferência para um meio sem droga as células retomaram o seu crescimento normal. Nas células expostas à vancomicina este crescimento, monitorizado por contagem de células viáveis, mostrou-se mais rápido do que o da cultura controlo. Nas células expostas às concentrações de 10x e 40x CIM de metronidazol, os sinais de recuperação da taxa de crescimento normal só foram visíveis, após 1h e 2.5h de incubação, respectivamente. Esta supressão temporária do crescimento bacteriano que se verifica após breve exposição a um antibiótico, é conhecido por efeito pós-antibiótico (PAE) e tem sido observado com um grande número de agentes antimicrobianos frente a uma grande variedade de bactérias e fungos (Baquero *et al.*, 1986; Bundtzen *et al.*, 1981; Bush *et al.*, 1989; Craig & Gudmundsson, 1986; Drabu & Blakemore, 1991; Hamilton & Shah, 1993; Isaksson *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1992; Tsui *et al.*, 1993; Yagi *et al.*, 1992). O termo "pós-antibiótico" realça bem que este efeito é o resultado da exposição prévia ao agente antimicrobiano não se devendo à presença contínua de concentrações sub-inibitórias da droga. Este efeito foi também já demonstrado *in vivo* (Craig, 1993; Renneberg & Walder, 1989) mas o significado clínico deste fenómeno permanece ainda controverso. O PAE pode influenciar o regime de dosagem do agente antimicrobiano na prática clínica (Craig & Gudmundsson, 1986), já que teóricamente o intervalo que medeia entre a administração das doses deverá ser equivalente ao tempo em que os níveis do antibiótico excedem o CIM mais o tempo de duração do PAE (Vogelman *et al.*, 1988). O efeito bactericida do antibiótico reduz a população bacteriana infecciosa enquanto que o seu PAE assegura uma inibição persistente após exposição ao agente antimicrobiano. Assim antibióticos com PAEs prolongados poderão ser administrados menos frequentemente que aqueles que possuem PAEs curtos, já que os níveis de antibiótico no local da infecção, mesmo descendo abaixo do CIM na fase final do intervalo da dosagem, garantirão uma ausência da multiplicação bacteriana. A ausência de um PAE significativo indicará a necessidade das concentrações do antibiótico se situarem sempre acima do CIM durante todo

o tempo que medeia entre os intervalos da dosagem. Os estudos em animais têm confirmado que a presença de PAEs prolongados *in vivo* permite estabelecer regimens de dosagem mais amplos (Craig, 1993; Renneberg & Walder, 1989). Recentemente foi demonstrado que bactérias previamente expostas a concentrações supra-inibitórias de antibióticos, que sofrem posteriormente uma exposição a concentrações sub-inibitórias, apresentam maior tempo de supressão do seu crescimento que bactérias sem prévia exposição (Cars & Odenholt-Tornqvist, 1993; Lowdin, 1993; Odenholt-Tornqvist *et al.*, 1992; Odenholt-Tornqvist, 1993). Este fenómeno, conhecido por efeito pós-antibiótico sub-MIC (PASME), reveste-se de particular interesse já que na clínica, onde doses intermitentes são frequentemente usadas, a concentração dos antibióticos flutua desde concentrações supra-inibitórias, após as administrações, até às concentrações sub-inibitórias que ocorrem no período de intervalo das dosagens.

A presença e a duração do PAE variam significativamente com as várias combinações microorganismo-agente antimicrobiano (Craig & Gudmunsson, 1986). Assim os inibidores da síntese proteica (macrólidos, tetraciclina e aminoglicosídeos), inibidores da RNA polimerase (rifampicinas) e inibidores da DNA girase (quinolonas) apresentam constantemente, em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, PAEs longos de algumas horas (Gerber, 1993). Já pelo contrário os PAEs produzidos pelos antibióticos β -lactâmicos mostram-se menos constantes, apresentando-se normalmente longos em bactérias Gram-positivo, mas geralmente insignificantes em bactérias Gram-negativo (Gerber, 1993). Embora esteja ainda por definir o mecanismo exacto que leva ao aparecimento do PAE, pensa-se que este deve envolver alterações não letais induzidas pelo agente antimicrobiano ou mesmo a persistência limitada da droga no seu local de acção (Bundtzen *et al.*, 1981). Se por um lado o PAE dos inibidores ribossomais que se ligam de modo reversível às sub-unidades (macrólidos, lincomicina, tetraciclina, cloranfenicol e rifampicinas) pode representar o tempo necessário para a dissociação da droga do ribossoma, nos inibidores que se ligam a estas sub-unidades de modo irreversível (aminoglicosídeos) ele pode ser o reflexo de uma qualquer alteração não letal (Bermudez, 1992). No caso dos antibióticos β -

lactâmicos, é possível que o PAE, represente o tempo que a bactéria leva a sintetizar ou a regenerar as PBPs envolvidas na síntese da parede celular, às quais estes antibióticos se ligaram covalentemente (Bundtzen *et al.*, 1981).

Poucos são os trabalhos que têm visado o estudo do PAE de agentes antimicrobianos em bactérias anaeróbias estritas, sendo esta a primeira vez em que este efeito é estudado em *C. difficile*. Muitos factores influenciam a duração e mesmo a presença do PAE, como o tipo de microorganismo, a classe e a concentração do agente antimicrobiano, a duração de exposição à droga (Craig & Gudmundsson, 1986; Vogelman & Craig, 1985). No nosso estudo variámos dois destes factores, nomeadamente o tempo de exposição e a concentração do agente antimicrobiano. A técnica por nós usada na quantificação do PAE da vancomicina e do metronidazol em *C. difficile*, envolveu a determinação do crescimento bacteriano por contagem de células viáveis, após remoção do agente antimicrobiano por diluição (Bundtzen *et al.*, 1981; Craig & Gudmundsson, 1986). Obtivemos apenas um PAE significativo (2.4h) com a concentração de 40x CMI de metronidazol. Embora relativamente alta, esta concentração é comparável à que ocorre nas fezes após administração oral ou intravenosa (10mg/l; Bolton & Culshaw, 1986). Curiosamente obtiveram-se valores de PAE negativos para todas as concentrações de vancomicina testadas e com a concentração de 5x CMI de metronidazol. PAE negativos são geralmente obtidos quando bactérias Gram negativo são expostas a baixas concentrações de antibióticos β -lactâmicos e a avaliação é feita pelo método da contagem de células viáveis (Bundtzen *et al.*, 1981; Hanberger *et al.*, 1990; Craig & Gudmundsson, 1986). Este valor negativo, deve-se à formação de filamentos induzida por estes antibióticos e reflecte o aumento rápido das c.f.u, que ocorre nas culturas tratadas, quando estes filamentos se dividem e revertem à morfologia normal (Craig & Gudmundsson, 1986). O método de contagem de viáveis é fundamentalmente imperfeito porque se baseia no facto de uma c.f.u. corresponder apenas a um genoma bacteriano. Neste caso particular, em que a bactéria tende a formar filamentos quando exposta à droga, um filamento pode conter várias células. Após remoção do fármaco, cada filamento divide-se em várias bacilos, agora com morfologia normal, dando assim a impressão de ter havido um crescimento mais rápido

no número de c.f.u. na cultura exposta ao antibiótico comparativamente à cultura não exposta, obtendo-se assim um PAE negativo. O método de contagem de viáveis dá pois, nestes casos em que se verifica a formação de filamentos, a ideia falsa de um baixo número de bactérias imediatamente após a remoção do antibiótico, dando origem a um valor de PAE mais baixo que o verdadeiro. Embora seja o método mais vulgarmente usado nos estudos de PAE é um método extremamente laborioso, demorado e com uma reprodutibilidade pouco elevada, sendo muitas as tentativas de substituição por métodos alternativos onde a determinação da contagem de viáveis é eliminada e o crescimento bacteriano é agora monitorizado por bioluminescência do ATP bacteriano (Hanberger *et al.*, 1990; Isaksson *et al.*, 1993; MacKenzie *et al.*, 1994), por espectrofotometria (Rescott *et al.*, 1988), por contagem electrónica de partículas e condutividade eléctrica (Baquero *et al.*, 1986; MacKenzie *et al.*, 1994; Nadler *et al.*, 1989), por fotometria vertical (Lowdin *et al.*, 1993). Para alguns autores o método da bioluminescência aparece como método ideal para o estudo do PAE nos casos em que há indução de filamentação, já que não se verifica a aceleração no crescimento bacteriano durante a resseptação do filamento como quando da monitorização do crescimento por contagem de viáveis (Hanberger *et al.*, 1990). Um filamento que corresponda a 20 bactérias é medido como uma c.f.u. por contagem de viáveis, mas quando medido por bioluminescência o filamento correspondente possuirá uma biomassa de 20 bactérias.

Os valores negativos de PAE apresentados pela vancomicina e pelo metronidazol poderão ser então explicados pela capacidade que estes agentes antimicrobianos mostraram em induzir a filamentação do *C.difficile* e pelo facto de se ter usado o método da contagem de viáveis na quantificação deste efeito. Já o valor de PAE positivo de 2.4h obtido com a concentração 40xCIM de metronidazol, pode talvez ficar a dever-se ao grande decréscimo verificado no número de células viáveis após contacto com o agente antimicrobiano. A descida verificada no número de células viáveis no início da fase de PAE do metronidazol, poderá reflectir uma persistência da acção da droga no momento que se segue à sua remoção.

A ausência de um efeito bactericida eficaz e a inexistência de um PAE significativo, por parte

da vancomicina, mesmo para concentrações da ordem dos 22.5mg/l, leva a concluir que um tratamento eficaz com este antibiótico necessitará da administração de múltiplas doses e intervalos de dosagem relativamente curtos afim de que a sua concentração no intestino seja sempre mantida acima do CIM. No entanto, devido à má absorção deste antibiótico, concentrações muito superiores às referidas (1000mg/l) são facilmente atingidas no lúmen do cólon após tratamento oral com vancomicina (Levett, 1991). Estas concentrações mostram, curiosamente, apenas um efeito bacteriostático em *C.difficile* (Levett, 1991). O metronidazol ao apresentar, para uma concentração semelhante à que é atingida no lúmen do cólon, um efeito bactericida importante e um PAE significativo, sugere que este agente antimicrobiano poderá ser administrado com maior segurança e com intervalos ligeiramente mais longos que a vancomicina. Experiências *in vivo* são no entanto necessárias afim de se averiguar a importância clínica destas observações.

O aspecto clínico mais relevante do PAE será, no entanto, aquele que visará a supressão pós-antibiótica dos factores de virulência e toxicidade bacteriana mais do que a supressão do crescimento bacteriano (Gerber, 1993; Guan & Burnham, 1992). As experiências futuras em *C. difficile*, deverão pois concentrar-se num PAE definido como a supressão pós-antibiótica da produção e libertação das duas exotoxinas bacterianas, toxina A e toxina B, a quem o *C.difficile* deve o seu efeito patogénico.

Conclusões Gerais

Dos resultados discutidos nesta dissertação salientamos as seguintes conclusões gerais:

1- *C. difficile* apresenta uma parede celular complexa constituída por uma camada osmiofílica, com 19.6nm, correspondente à matriz do peptidoglicano, típica das bactérias Gram positivo e uma camada superficial (S-layer), com 17.5nm, de natureza proteica, menos electronodensa. A diferença de densidade electrónica apresentada pelas duas camadas está associada ao processo de fixação, obtendo-se melhor contraste com o processo OsO₄/GAFACA.

O aspecto ultraestrutural da S-layer parece variar com o processo de fixação utilizado, apresentando um aspecto "ondulado" em células fixadas com GAFACA/OsO₄ e um aspecto "rectilíneo" em células fixadas com OsO₄/GAFACA.

2- A S-layer de *C. difficile* apresenta a capacidade de se justapôr a ambos os lados da camada de peptidoglicano e está presente em todas as fases do crescimento e divisão celular, não desaparecendo nem mesmo após crescimento contínuo em laboratório.

A S-layer é constituída pela repetição de duas sub-unidades proteicas diferentes cujos pesos moleculares variam ligeiramente entre as várias estirpes. É possível agrupar as estirpes de *C. difficile* em três grupos, com base nos pesos moleculares apresentados por estas duas proteínas em SDS-PAGE: (i) grupo contendo proteínas com 48-50kDa e 34-35kDa, (ii) grupo contendo proteínas com 41kDa e 34kDa, (iii) grupo contendo proteínas com 47kDa e 41kDa. Não parece existir nenhuma correlação entre o perfil electroforético apresentado pelas duas proteínas e a capacidade de produção de toxina A, exibindo as estirpes toxígenas perfis idênticos às estirpes não toxígenas.

3- A membrana citoplasmática de *C. difficile* exhibe um perfil assimétrico, típico das bactérias Gram-positivo aeróbias-anaeróbias facultativas, mas este perfil é difícil de evidenciar mesmo nas células fixadas em anaerobiose pelo processo GAFACA/OsO₄, processo que melhor preserva a membrana citoplasmática deste bacilo anaeróbio estrito. Células fixadas com OsO₄/GAFACA, apresentam membranas mal preservadas, com solubilização em certos locais e perfil simétrico.

Sómente o folheto externo da membrana citoplasmática exhibe componentes PAS-positivos, mas apenas exposições à tiosemicarbazida superiores a 28 h são capazes de os revelar.

A membrana citoplasmática de protoplastos de *C. difficile* apresenta um perfil assimétrico idêntico ao observado nas correspondentes células intactas, verificando-se também a passagem para perfil simétrico quando ocorre distúrbio do protoplasto.

4- A membrana citoplasmática de células de *C. difficile* em fase de declínio ou expostas ao ar exhibe perfil simétrico. A degradação da parede celular de células em fase de declínio é posterior às alterações da membrana e parece ser mais eficaz em meio líquido que em meio sólido. A exposição de células de *C. difficile* ao ar parece estar relacionada com uma degradação muito rápida da parede celular.

5- Para a obtenção de protoplastos de *C. difficile*, é necessário, uma concentração relativamente elevada de lisozima (1mg/ml) e um tempo de actuação um tanto longo (4-5h), comparativamente a outras bactérias Gram-positivo. A produção eficaz de protoplastos é conseguida pela adição directa de uma cultura em fase exponencial a uma solução osmótica constituída por caldo Schaedler, sacarose e glicina. A substituição do caldo Schaedler por tampão fosfato de sódio ou tampão Tris-HCl (0.05M), leva, respectivamente, ao aparecimento de apenas um pequeno número de protoplastos ou à ausência total da sua produção.

A presença de glicina na solução osmótica aumenta de modo significativo o número e a velocidade de formação de protoplastos de *C. difficile*. A adição de EDTA provoca uma redução no número de protoplastos produzidos e uma diminuição do seu tamanho relativo.

6- O aparecimento de mesossomas em *C. difficile* está directamente associado ao processo de fixação OsO₄/GAFACA. Só raramente se detectam mesossomas em células fixadas com GAFACA/OsO₄.

7- A esporulação de *C. difficile* desenrola-se em termos gerais segundo um processo idêntico ao observado noutras espécies do género *Clostridium* sendo a seguinte a sequência de formação das estruturas do esporo: (i) parede esporal, túnica interna e exospório; (ii) cortéx; (iii) túnica externa.

Salientam-se as seguintes características originais na ultraestrutura dos esporos de *C. difficile* : (i) túnica interna de estrutura lamelar, constituída por 5-8 lamelas; (ii) túnica externa espessa e electronodensa de aspecto crenado não estratificado; (iii) exospório em forma de saco.

O exospório, que desaparece quando os esporos livres são tratados com ureia-mercaptoeanol, parece começar a formar-se numa fase precoce da esporulação, antes do aparecimento da túnica externa, mas a sua visualização só é bem evidente após lise do esporângio.

8- O E teste pode substituir eficazmente a laboriosa técnica de referência na determinação do CIM da vancomicina e metronidazol contra *C. difficile* já que os valores obtidos se mostram comparáveis aos obtidos pelo método de diluição em agar.

9- A concentração sub-inibitória CIM/2 de vancomicina provoca um atraso significativo no crescimento de *C. difficile* ao mesmo tempo que induz o aparecimento de formas filamentosas curtas, predominantemente Gram negativas, e que revelam a nível ultraestrutural a presença de múltiplos septos parietais e espessamento das paredes celulares.

A concentração sub-inibitória CIM/2 de metronidazol afecta ligeiramente o crescimento de *C. difficile*, provocando o aparecimento de longos filamentos que coram predominantemente de Gram positivo, e induzindo um fenómeno de aderência entre as células.

A filamentação de células de *C. difficile*, induzida por concentrações sub-inibitórias de vancomicina e metronidazol, é mais evidente quando o crescimento se realiza em meio sólido.

10- A exposição de *C. difficile* a concentrações supra-inibitórias de vancomicina, correspondentes a 5x, 10x e 30x CIM, provoca o aparecimento de grandes filamentos, que se caracterizam pela ausência de septos de divisão.

O crescimento de *C. difficile*, monitorizado por contagem de células viáveis, mostra-se mais rápido após exposição prévia a concentrações supra-inibitórias (5x, 10x e 30x CIM) de vancomicina.

11- A exposição de *C. difficile* a concentrações supra-inibitórias de metronidazol, correspondentes a 5x, 10x CIM, induz o aparecimento de grandes filamentos. Concentrações de 40x CIM originam perda da morfologia bacilar.

A exposição prévia de *C. difficile* a concentrações supra-inibitórias de 10x e 40x CIM de metronidazol leva a uma supressão temporária (de 1 h e 2.5 h, respectivamente) do seu crescimento, monitorizado por contagem de células viáveis.

12- Concentrações de 5x, 10x e 30x CIM de vancomicina e 5x CIM de metronidazol produzem PAEs negativos em *C. difficile*, quando este efeito é avaliado pelo método de contagem de viáveis. Estes PAEs negativos encontram-se associados à presença de filamentos e ocorrem na ausência de uma acção bactericida significativa.

A concentração de 40x CIM de metronidazol produz um PAE significativo de 2.5 h encontrando-se associado a uma acção bactericida significativa.

13- O aumento do tempo de exposição ao agente antimicrobiano de 1h para 2h não influencia o PAE da vancomicina nem do metronidazol mas o poder bactericida da vancomicina parece depender da duração desta exposição.

Bibliografia

- Adams, D. M. 1973. Inactivation of *Clostridium perfringens* type A spores at ultrahigh temperatures. *App. Microb.* **26**: 282-287.
- Ahlgren, T., Florin, I., Jarstrand, C. & Thelestam, M. 1983. Loss of surface fibronectin from human lung fibroblasts exposed to cytotoxin from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **39**: 1470-1472.
- Al-Jumaili, I. J., Shibley, M., Lishman, A. H. & Record, C. O. 1984. Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 77-78.
- Allcock, E. R., Reid, S. J., Jones, D. T. & Woods D. R. 1982. *Clostridium acetobutyricum* protoplast formation and regeneration. *Appli. Environ. Microbiol.* **43**: 719-721.
- Anand, A. & Glatt, A. E. 1993. *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. *Clin. Infect. Dis.* **17**:109-113.
- Bacon, A. E., Fekety, R., Schaberg, D. R. & Faix, R. G. 1988. Epidemiology of *Clostridium difficile* colonization in newborns: results using a bacteriophage and bacteriocin typing system. *J. Infect. Dis.* **158**: 349-354.
- Balassa, G., Milhaud, P., Raulet, E., Silva, M. T. & Sousa, J. C. F. 1979. A *Bacillus subtilis* mutant requiring dipicolinic acid for the development of heat-resistant spores. *J. Gen. Microbiol.* **110**: 365-379.
- Banno, Y., Kobayashi, T., Kono, H., Watanabe, K., Ueno, K. & Nozawa, Y. 1984. Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. *Rev. Infect. Dis.* **6**: S11-S20.
- Baquero, F., Culebras, E., Patrón, C., Pérez-Dias, J. C., Medrano, J. C. & Vicente, M. F. 1986. Postantibiotic effect of imipenem of Gram-positive and Gram-negative micro-organism. *J. Antimicrob. Chemother.* **18** (Suppl. E): 47-59.
- Barbut, F., Corthier, G. & Petit, J-C. 1992. Mécanismes physiopathologiques des infections digestives à *Clostridium difficile*: *Médecine/Sciences.* **8**: 214-222.
- Barbut, F., Depitre, C., Delmée, M., Corthier, G. & Petit, J.-C. 1993. Comparison of enterotoxin production, cytotoxin production, serogrouping, and antimicrobial susceptibilities of *Clostridium difficile* strains isolated from AIDS and human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin. Microb.* **31**: 740-742.
- Barna, J. C. J. & Williams, D. H. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 339-357.
- Barroso, L. A., Wang, S-Z., Phelps, C. J., Johnson, J. L. & Wilkins T. D. 1990. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4004.
- Bartlett, J. G. 1981. Antimicrobial agents implicated in *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea or colitis. *Johns Hopkins Med. J.* **149**: 6-9.
- Bartlett, J. G. 1990. *Clostridium difficile*: clinical considerations. *Rev. Infect. Dis.* **12** (Suppl. 2): 243-251.
- Bartlett, J. G. 1992. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 573-581.
- Bartlett, J. G. 1994. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and current state of knowledge about the organism. *Clin. Infect. Dis.* **18** (Suppl. 4): S265-S272.
- Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* **298**: 531-534.
- Bayen, H., Frehel, C., Ryter, A & Sebald M. 1967. Étude cytologique de la sporulation chez *Clostridium histolyticum*. Souche sporogène et mutants de sporulation. *Ann. Inst. Pasteur.* **113**: 163-173.

- Beall, B., Lowe, M. & Lutkenhaus, J. 1988. Cloning and characterization of *Bacillus subtilis* homologous of *Escherichia coli* cell division genes *fts Z* and *fts A*. *J. Bacteriol.* **170**: 4855-4864.
- Begg, K., Takasuga, A., Edwards, D. H., Dewar, S. J., Spratt, B. G., Adachi, H., Otha, T., Matsuzawa, H. & Donachie, W. D. 1990. The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. *J. Bacteriol.* **172**: 6697-6703.
- Bermudez, L. E., Wu, M., Young, L. S. & Inderlied, C. B. 1992. Postantibiotic effect of amikacin and rifapentine against *Micobacterium avium* complex. *J. Infect. Dis.* **166**: 923-926.
- Beveridge, T. J. & Graham L. L. 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 684-705.
- Beveridge, T. J. & Murray, R.G.E. 1976. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **127**: 1502-1518.
- Beveridge, T. J. & Murray, R.G.E. 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**: 876-887.
- Beveridge, T. J. 1981. Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int. Rev. Cytol.* **72**: 229-317.
- Beveridge, T. J. 1990. Mechanism of Gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1609-1620.
- Biavasco, F., Manso, E. & Varaldo, P. E. 1991. In vitro activities of ramoplanin and four glycopeptide antibiotics against clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 195-197.
- Bolmstrom, A., Arvidson S., Ericsson M. & Karlsson.A. 1989. Antimicrobial susceptibility testing for anaerobes with a novel technique, the PDM Epsilometer. *In* Third European Congress on Anaerobic Bacteria and Infections. Munich. Abstract C 6.
- Bolton, R. P. & Culshaw, M. A. 1986. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. *Gut.* **27**: 1169-1172.
- Bolton, R. P., Tait, S. K., Dear, P. R. F. & Losowsky, M. S. 1984. Asymptomatic neonatal colonisation by *Clostridium difficile*. *Arch. Dis. Child.* **59**: 466-472.
- Borriello, S. P. & Honour, P. 1983. Concomitance of toxigenic and non-cytotoxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens. *J. Clin. Microb.* **18**: 1006-1007.
- Borriello, S. P., Davies, H. A., Kamiya, S., Reed, P. J. & Seddon, S. 1990. Virulence factors of *Clostridium difficile*. *Rev. Infect. Dis.* **12** (Suppl. 2): S185-190.
- Borriello, S. P., Vale, T., Brazier, J. S., Hyde, S. & Chippeck, E. 1992.a. Evaluation of a commercial kit for the detection of *Clostridium difficile* toxin A. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**: 360-363.
- Borriello, S. P., Wren, B. W., Hyde, S., Seddon, S. V., Sibbons, P., Krishna, M. M., Tabaqchali, S., Manek, S. & Price, A. B. 1992.b. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **60**: 4192-4199.
- Botta, G. A. & Park, J. T. 1981. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation, but not during cell elongation. *J. Bacteriol.* **145**: 333-340.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Buggy, B.P., Wilson, K. H. & Fekety R. 1983. Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. *J. Clin. Microb.* **18**: 348-352.

- Bundtzen, R. W., Gerber, A. U., Cohn, D. L. & Craig, W.A. 1981. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev. Infect. Dis.* 3: 28-37.
- Bush, L. M., Boscia, J. A., Wendeler, M., Pitsakis, P. G. & Kaye, D. 1989. In vitro postantibiotic effect of daptomycin (LY146032) against *Enterococcus faecalis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1198-1200.
- Calvacanti, S. M. B., Domingues, R. M. C. P., Ferreira, M. C. S., Filho, F. C. S. 1991. Effect of metronidazole on surface properties of *Bacteroides fragilis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 819-826.
- Cars O. & Odenholt-Tornqvist, I. 1993. The postantibiotic sub-MIC effect *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 (Suppl. D): 159-166.
- Carvalho, M. E. S. B. 1987. Autólise e heterólise de *Streptococcus faecium*. Tese de doutoramento. Universidade do Porto.
- Chang, K. Y. & Carr, C. W. 1971. Studies on the structure and function of lysozyme. 1. The effect of pH and cation concentration on lysozyme activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 229: 496-503.
- Chassy, B. M. & Giuffrida, A. 1980. Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 153-158.
- Clabots, C. R., Johnson, S., Olson, M. M., Peterson, L. R. & Gerding, D. N. 1992. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J. Infect. Dis.* 166: 561-567.
- Cooperstock, M., Riegle, L., Woodruff, C. W. & Onderdonk, A. 1983. Influence of age, sex, and diet of infants with *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 17: 830-833.
- Corthier, G., Dubos, F. & Ducluzeau. 1986. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.* 32: 894-896.
- Craig, W. A. 1993. Post-antibiotic effects in experimental infection models: relationship to in-vitro phenomena and to treatment of infections in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 (Suppl. D): 149-158.
- Craig, W.A. & Gudmunsson, S. 1986. The postantibiotic effect. *In* Antibiotics in Laboratory Medicin. 2nd edn. (Lorian, V., Ed.) pp.515-36. Williams & Williams Co., Baltimore, MD.
- Cudmore, M.A., Silva, J.Jr, Fekety, R., Liepman, M. K. & Kim, K. H. 1982. *Clostridium difficile* colitis associated with cancer chemotherapy. *Arch. Intern. Med.* 142: 333-335.
- Dailey, D.C., Kaiser, A. & Scholmer, R.H. 1987. Factors influencing the phagocytosis of *Clostridium difficile*. by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 55: 1541-1546.
- Dancer, B. N. 1979. Requirement for peptidoglycan synthesis during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 140: 786-797.
- DeLalla, F., Nicolini, R., Rinaldi, E., Scarpellini, P., Rigoli, R., Manfrin V. & Tramarin, A. 1992. Prospective study of oral teicoplanin versus oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and *Clostridium difficile* associated-diarrhoea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2192-2196.
- Delmée, M., Laroche, Y., Avesani, V. & Cornelis, G. 1986. Comparison of serogrouping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microb.* 24: 991-994.
- Delmée, M. & Avesani, V. 1990. Virulence of ten serogroups of *Clostridium difficile* in hamsters. *J. Med. Microbiol.* 33: 85-90.
- Delmée, M., Homel, M. & Wauters, G. 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J. Clin. Microb.* 21: 323-327.

- Devlin, H. R., Au W., Foux L. & Bradbury W. C. 1987. Restriction endonuclease analysis of nosocomial isolates of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microb.* **25**: 2168-2172.
- Dipersio, J. R., Varga, F. J., Conwell, D. L., Kraft, J. A., Kozak, K. J. & Willis, D. H. 1991. Development of a rapid enzyme immunoassays for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *J. Clin. Microb.* **29**: 2724-2730.
- Donta, S. T. & Meyers, M. G. 1982. *Clostridium difficile* toxin in asymptomatic neonates. *J. Pediatr.* **100**: 431-434.
- Dove, C. H., Wang, S.-Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyerly, D. M., Wilkins T. D. & Johnson, J. L. 1990. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect. Immun.* **58**: 480-488.
- Drabu, Y. J. & Blakemore, P. H. 1991. The post-antibiotic effect of teicoplanin: monotherapy and combination studies. *J. Antimicrob. Chemother.* **27** (Suppl. B): 1-7.
- Duncan, C. L. & Strong, D.H. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology.* **16**: 82-89.
- Dyas, A & Das B. C. 1985. The activity of glutaraldehyde against *Clostridium difficile*. *J. Hospital Infect.* **6**: 41-45.
- Dzink, J. & Bartlett, J.G. 1980. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**: 695-698.
- Edwards, D. I. 1977. The action of metronidazole on DNA. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**: 43-48.
- Eichel-Streiber, C. V., Harperath, U., Bosse, D. & Hadding U. 1987. Purification of two high molecular weight toxins of *Clostridium difficile* which are antigenically related. *Microbial Pathogenesis.* **2**: 307-318.
- Elmer, G. W. & McFarland, L. V. 1987. Suppression by *Saccharomyces boulardii* of toxigenic *Clostridium difficile* overgrowth after vancomycin treatment in hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1129-1131.
- Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* Sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 1-33.
- Fiorentini, C., Donelli, G., Nicotera, P. & Thelestam, M. 1993. *Clostridium difficile* toxin A elicits Ca²⁺-independent cytotoxic effects in cultured normal rat intestinal crypt cells. *Infect. Immun.* **61**: 3988-3993.
- Fiorentini, C., Malorni, W., Paradis, S., Giuliano, M., Mastrantonio, P. & Donelli, G. 1990. Interaction of *Clostridium difficile* toxin A with cultured cells: cytoskeletal changes and nuclear polarization. *Infect. Immun.* **58**: 2329-2336.
- Fitz-James, P. C. & Young, I. E. 1969. Morphology of sporulation. Citado por Piggot, P. J. & Coote, J. G. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.* **40**: 908-962.
- Fluit, A. D. C., Wolfhagen, M. J. H. M., Verdonk, G. P. H. T., Jansze, M., Torensma, R. & Verhoef, J. 1991. Nontoxigenic strains of *Clostridium difficile* lack the genes for both toxin A and toxin B. *J. Clin. Microb.* **29**: 2666-2667.
- Freese, E. 1972. Sporulation of bacilli, a model of cellular differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **7**: 85-124.
- Freese, E. 1981. Initiation of bacterial sporulation. Citado por Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 1-33.
- George, W. L., Rolfe, R. D. & Finegold, S. M. 1980. Treatment and prevention of antimicrobial agent-induced colitis and diarrhea. *Gastroenterology.* **79**: 368-372.

- George, W. L., Sutter, V. L., Goldstein, E. J. C., Ludwin, S. L. & Finegold, S. M. 1978. Aetiology of antimicrobial agent-associated colitis. *Lancet* **1**: 802-803.
- Gerber, A. U. 1993. Postantibiotic effect: an update and outlook on clinical relevance. *Current Opinion Infect. Dis.* **6**: 751-757.
- Gorbach, S.L., Chang, T. & Golden, B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet* **2**: 1519.
- Graham, L.L. & Beveridge T.J. 1994. Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. *J. Bacteriol.* **176**: 1413-1421.
- Grossman, A. D. & Losick, R. 1988. Extracellular control of spore formation of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4369-4373.
- Guan, L. & Burnham, J. C. 1992. Postantibiotic effect of CI-960, enoxacin and ciprofloxacin on *Escherichia coli*: effect on morphology and haemolysin activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**: 529-538.
- Guinand, M., Michel, G. & Tipper, D. J. 1974. Appearance of a γ -D-glutamyl-(L)-*meso*-diaminopimelate peptidoglycan hydrolase during sporulation in *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **120**: 173-184.
- Hagiya, H., Oka, T., Tsuji, H. & Takumi, K. 1992. The S layer composed of two different protein subunits from *Clostridium difficile*. GAI 1152: a simple purification method and characterization. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**: 63-74.
- Hamilton, J.M.T. & Shah, S. 1993. Post-antibiotic effects of miocamycin, roxithromycin and erythromycin on Gram-positive cocci. *Internat. J. Antimicrob. Agents.* **2**: 105-109.
- Hanberger, H., Nilsson, L. E., Kihlstrom, E. & Maller, R. 1990. Postantibiotic effect of β -lactam on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 102-106.
- Harry, E. J., Stewart, B. J. & Wake, R. G. 1993. Characterization of mutations in *div* IB of *Bacillus subtilis* and cellular localization of the Div IB protein. *Mol. Microbiol.* **7**: 611-621.
- Hayat, M. A. 1970. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. vol.1. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Hayat, M. A. 1981. Fixation for electron microscopy. Academic Press, Inc., New York.
- Heard, S. R., O'Farrell, S., Holland, D., Crook, S., Barnett, M.J. & Tabaqchali, S. 1986. The epidemiology of *Clostridium difficile* with use of a typing scheme: nosocomial acquisition and cross-infection among immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* **153**: 159-162.
- Hessen, M. T., Ptsakis, P. G. & Levison, M. E. 1989. Postantibiotic effect of penicillin plus gentamicin versus *Enterococcus faecalis* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 608-611.
- Hirschhorn, L. R., Trnka, Y., Onderdonk, A., Lee M.-L.T. & Platt, R. 1994. Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* -associated diarrhea. *J. Infect. Dis.* **169**: 127-133.
- Hoeninger, J. F. M., Stuart, P. F. & Holt, S.C. 1968. Cytology of spore formation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **96**: 1818-1834.
- Horne, D. & Tomasz, A. 1979. Release of lipoteichoic acid from *Streptococcus sanguis*: stimulation of release during penicillin treatment. *J. Bacteriol.* **137**: 1180-1184.
- Huff, E. 1982. Lipoteichoic acid, a major amphiphile of Gram-positive bacteria that is not readily extractable. *J. Bacteriol.* **149**: 399-402.

- Hughes, A. M., Hancock, I. C. & Baddiley, J. 1973. The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem. J.* **132**: 83.
- Illing, N. & Errington, J. 1991. Genetic regulation of morphogenesis in *Bacillus subtilis* : roles of σ^E and σ^F form in prespore engulfment. *J. Bacteriol.* **173**: 3159-3169.
- Isaksson, B., Maller, R., Nilsson, L. E. & Nilsson, M. 1993. Postantibiotic effect of aminoglycosides on staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**: 215-222.
- Jenkinson, H. F. 1981. Germination and resistance defects in spores of a *Bacillus subtilis* mutant lacking a coat polypeptide. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 81-91.
- Jenkinson, H. F., Sawyer, W. D. & Mandelstam, J. 1981. Synthesis and order of assembly of spore coat proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 1-16.
- Johnson, S., Adelman, A., Clabots, C. R., Peterson, L. R. & Gerding, D. N. 1989. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. *J. Infect. Dis.* **159**: 340-343.
- Johnson, S., Clabots, C. R., Linn, F. V., Olson, M. M., Peterson, L. R. & Gerding, D. N. 1990. Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. *Lancet.* **336**: 97-100.
- Jokipii, A. M. & Jokipii, L. 1987. Comparative activity of metronidazole and tinidazole against *Clostridium difficile* and *Peptostreptococcus anaerobius*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1569-1574.
- Jordan, D. C. & Innis, W. E. 1959. Selective inhibition of ribonucleic acid synthesis in *Staphylococcus aureus* by vancomycin. *Nature.* **184**: 1894-1895.
- Jordan, D.C. 1965. Effect of vancomycin on the synthesis of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* **11**: 390-393.
- Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H. & Nakamura, S. 1989. Recovery of spores of *Clostridium difficile* altered by heat or alkali. *J. Med. Microbiol.* **28**: 217-221.
- Kato, H., Cavallaro, J. J., Kato, N., Bartley, S.L., Killgore, G. E., Watanabe, K. & Ueno K. 1993. Typing of *Clostridium difficile* by Western immunoblotting with 10 different antisera. *J. Clin. Microb.* **31**: 413-415.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Ueno K., Ushijima, H., Hashira, S. & Abe T. 1994. Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microb.* **32**: 2067-2070.
- Kato, N., Ou, C.-Y., Kato, H., Bartley, S.L., Brown, V. K., Dowell, Jr., V. R., & Ueno K. 1991. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.* **29**: 33-37.
- Kawata, T., Takeoka A., Takumi K. & Masuda K. 1984. Demonstration and preliminary characterization of a regular array in the cell wall of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters* **24**: 323-328.
- Ketley, J. M., Haslam S. C., Mitchell T. J., Stephen J., Candy D.C.A. & Burdon D. W. 1984. Production and release of toxins A and B by *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* **18**: 385-391.
- Ketley, J. M., Mitchell T. J., Haslam S. C., Stephen J., Candy D.C.A. & Burdon D. W. 1986. Sporogenesis and toxin A production by *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* **22**: 33-38.
- Killgore, G. E. & Kato, H. 1994. Use of arbitrary primer PCR to type *Clostridium difficile* and comparison of results with those by immunoblot typing. *J. Clin. Microb.* **32**: 1591-1593.
- Kim, K-H., Fekety, R., Batts, D. H., Brown, D., Cudmore, M., Silva, J.Jr. & Waters, D. 1981. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.* **143**: 42-50.

- Kim, K., Pickering, L. K., Dupont, H. L., Sullivan, N. & Wilkins, T. 1984. In vitro and in vivo neutralizing activity of human clostrum and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* **150**: 57-62.
- Knight, R. C., Skolimowski, I. M. & Edwards, D.I. 1978. The interaction of reduced metronidazole with DNA. *Biochemical Pharmacology.* **27**: 2089-2893.
- Knoop, F. C., Owens, M. & Crocker, I. C. 1993. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. *Clin. Microbol. Rev.* **6**: 251-265.
- Krivan, H. C., Clark, G. F., Smith, D. F. & Wilkins, T. D. 1986. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal α 1-3Gal β 1-4Glc NAc. *Infect. Immun.* **53**: 573-581.
- Kumar, A., Hay, M. B., Maier, G. A. & Dyke, J. 1992. Post-antibiotic effect of ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin and tobramycin for *Pseudomonas cepacia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**: 597-602.
- Kushnaryov, V. M. & Sedmak, J.J. 1989. Effect of *Clostridium difficile* enterotoxin A on ultrastructure of chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* **57**: 3914-3921.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Larson, H. E., Barclay, F. E., Honour, P. & Hill, I. D. 1982. Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J. Infect. Dis.* **146**: 727-733.
- Larson, H. E., Honour, P., Price A. B. & Borriello, S. P. 1978. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* **1**: 1063-1066.
- Levett, P. N. 1991. Time-dependent killing of *Clostridium difficile* by metronidazole and vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**: 55-62.
- Levin, P. A. & Losick, R. 1994. Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis*. that is required for vegetative and sporulation septum formation. *J. Bacteriol.* **176**: 1451-1459.
- Libby, J. M., Donta, S. T. & Wilkins, T. D. 1983. *Clostridium difficile* toxin A in infants. *J. Infect. Dis.* **148**: 606.
- Lima, A. A. M., Lysterly, D. M., Wilkins, T. D., Innes, D. J. & Guerrant, R. L. 1988. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect. Immun.* **56**: 582-588.
- Lorian, V. 1986. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: Effects on ultrastructure, their virulence, and susceptibility to immunodefenses. *In* Antibiotics in Laboratory Medicin. 2nd edn. (Lorian, V., Ed.) pp.596-668. Williams & Williams Co., Baltimore, MD.
- Lorian, V. 1993. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **31** (Suppl. D): 137-148.
- Losick, R. & Stragier, P. 1992. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature.* **355**: 601-604.
- Lowdin, E., Odenholt-Tornqvist, I., Bengtsson, S. & Cars O. 1993. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2200-2205.
- Lysterly, D. M., Barroso, L. A., Wilkins, T. D., Depitre, C. & Corthier, G. 1992. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **60**: 4633-4639.

- Lyerly, D. M., Krivan H. C. & Wilkins, T. D. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbol. Rev.* **1**: 1-18.
- Lyerly, D. M., Lockwood, D. E., Richardson, S. H. & Wilkins, T. D. 1982. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **35**: 1147-1150.
- Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K. & Wilkins, T. D. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.* **47**: 349-352.
- MacKenzie, F. M., Gould, I. M., Chapman, D. G. & Jason, D. 1994. Comparison of methodologies used in assessing the postantibiotic effect. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 223-230.
- Mahony, D. E., Clow, J., Atkinson, L., Vakharia, N. & Schlech, W. F. 1991. Development and application of a multiple typing system for *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1873-1879.
- Mandal, B. K., Watson, B. & Ellis, M. 1982. Pseudomembranous colitis in a 5-week-old infant. *Br. Med. J.* **284**: 345-346.
- Mandelstam, J. & Higgs, S. A. 1974. Induction of sporulation during synchronized chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **120**: 38-42.
- Markowitz, S. M. & Williams, D. S. 1985. Effect of L-cysteine on the activity of penicillin antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 419-421.
- Masuda, K. & Kawata, T. 1981. Characterization of a regular array in the wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to the other wall components. *J. Gen. Microbiol.* **124**: 81-90.
- Masuda, K., Itoh, M. & Kawata, T. 1989. Characterization and reassembly of a regular array in the cell wall of *Clostridium difficile* GAI 4131. *Microbiol. Immunol.* **33**: 287-298.
- Matsushashi, M., Wachi, M. & Ishino, F. 1990. Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res. Microbiol.* **141**: 89-103.
- McCoy, E.C., Doyle, D., Burda, K., Corbeill, L. B. & Winter A.J. 1975. Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. *Infect. Immun.* **11**: 517-525.
- McDonald, P. J., Wetherall, B. L. & Pruul, H. 1981. Postantibiotic leucocyte enhancement: increase susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leucocytes. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 38-44.
- McFarland, L. V., Elmer, G. W., Stamm, W. E. & Mulligan, M. E. 1991. Correlation of immunoblot type, enterotoxin production, and cytotoxin production with clinical manifestations of *Clostridium difficile* infection in a cohort of hospitalized patients. *Infect. Immun.* **59**: 2456-2462.
- McFarland, L. V., Mulligan, M. E., Kwok, R. Y. & Stamm, W. E. 1989. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N. Engl. J. Med.* **320**: 204-210.
- McFarland, L. V., Surawicz, C. M. & Stamm, W. E. 1990. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. *J. Infect. Dis.* **162**: 678-684.
- Messner, P. & Sleytr, U.B. 1992. Crystalline bacterial cell-surface layers. *Adv. Microb. Physiol.* **33**: 213-275.
- Messner, P., Bock, K., Christian, R., Schlz, G. & Sleytr, U.B. 1990. Characterization of the surface layer glycoprotein of *Clostridium symbiosum* HB25. *J. Bacteriol.* **172**: 2576-2583.
- Milhaud, P. & Balassa, G. 1973. Biochemical genetics of bacterial sporulation. IV. Sequential development of resistances to chemical and physical agents during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Molec. Gen. Genetics.* **125**: 241-250.

- Minton, N. P. & Morris, J. G. 1983. Regeneration of protoplast of *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. **J. Bacteriol.** **155**: 432-434.
- Miyazaki, S., Matsunaga, T., Kawasaki, K., Kobayashi, I., Tada, H., Yamaguchi, K. & Goto, S. 1992. Separate isolation of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells from the feces of newborn infants. **Microbiol. Immunol.** **36**: 131-138.
- Moir, A. 1981. Germination properties of a spore coat-defective mutant of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** **146**: 1106-1116.
- Mulligan, M. E., George, W. L., Rolfe, R. D. & Fineold, S. M. 1980. Epidemiological aspects of *Clostridium difficile*-induced diarrhea and colitis. **Am. J. Clin.Nutr.** **33**: 2533-2538.
- Munn, C. B., Ishiguro, E. E., Kay, W. W. & Trust, T.J. 1982. Role of surface component in serum resistant of virulent *Aeromonas salmonicida*. **Infect. Immun.** **36**: 1069-1075.
- Nadler, H. L., Curby, W. A., Forgacs, P. & Rosenberg, F. 1989. Comparison of electronic and viability counting methods for determination of postantibiotic effect of oxacillin on *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **33**: 2155-2156.
- Nagarajan, R. 1991. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. **Antimicrob. Agents Chemother.** **35**: 605-609.
- Nakamura, S., Yamakawa, K., Izumi, J., Nakashio, S. & Nishida S. 1985. Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. **Microbiol. Immunol.** **29**: 113-118.
- Nanninga, N. 1991. Cell division and peptidoglycan assembly in *E. coli*. **Mol. Microbiol.** **5**: 791-195.
- Noller, E. C. & Hartsell, S. E. 1961. Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae*. II. Pre and co-lytic treatments potentiating the action of lysozyme. **J. Bacteriol.** **81**: 492-499.
- Odenholt-Tornqvist, I. 1993. Studies on the postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. **J. Antimicrob. Chemother.** **31**: 881-892.
- Odenholt-Tornqvist, I., Lowdin, E. & Cars O. 1992. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloracin and amikacin. **Antimicrob. Agents Chemother.** **36**: 1852-1858.
- Pantosti, A., Luzzi, I., Cardines, R. & Gianfrilli, P. 1985. Comparison of the in vitro activities of teicoplanin and vancomycin against *Clostridium difficile* and their interactions with cholestyramine. **Antimicrob. Agents Chemother.** **28**: 847-848.
- Phelps, C. J., Lysterly, D. M., Johnson, J. L. & Wilkins T. D. 1991. Construction and expression of the complete *Clostridium difficile* toxin A gene in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **59**: 150-153.
- Piggot, P. J. & Coote, J. G. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. **Bacteriol. Rev.** **40**: 908-962.
- Pisabarro, A. G., Prats, R., Vázquez, D. & Rodríguez-Tébar. 1986. Activity of penicillin-binding protein 3 from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **168**: 199-206.
- Pitel, D. W. & Gilvarg, C. 1970. Mucopolysaccharide metabolism during growth and sporulation in *B. megaterium*. **J. Biol. Chem.** **245**: 6711-6717.
- Pitel, D. W. & Gilvarg, C. 1971. Timing of mucopolysaccharide and phospholipid synthesis in sporulating *B. megaterium*. **J. Biol. Chem.** **246**: 3720-3724.
- Popham, D. L. & Setlow, P. 1993. The cortical peptidoglycan from spores of *B. megaterium* and *Bacillus subtilis* is not highly cross-linked. **J. Bacteriol.** **175**: 2767-2769.

- Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., Kelly, C. P. & LaMont, J. T. 1993. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis: pathogenesis and therapy. *Intern. J. Antimicrob. Agents*. **3**: 17-32.
- Poxton, I. R. & Cartmill, T. D. I. 1982. Immunochemistry of the cell-surface carbohydrate antigens of *Clostridium difficile*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1365-1370.
- Privitera, G., Scarpellini, P., Ortisi, G., Nicastro, G., Niclin, R. & de Lalla, F. 1991. Prospective study of *Clostridium difficile* intestinal colonization and disease following single-dose antibiotic prophylaxis in surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 208-210.
- Pum D., Sára, M., & Sleytr, U. B. 1989. Structure, surface charge, and self-assembly of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *J. Bacteriol.* **171**: 5296-5303.
- Pum, D., Weinhandl, M., Hold, C. & Sleytr, U. B. 1993. Large-scale recrystallization of the S-layer of *Bacillus coagulans* E38-66 at the air/water interface and on lipid films. *J. Bacteriol.* **175**: 2762-2766.
- Qualman, S. J., Petric, M., Karmali, A. & Smith, C. R. 1990. *Clostridium difficile* invasion and toxin circulation in fatal pediatric pseudomembranous colitis. *Am. J. Clin. Pathol.* **94**: 410-416.
- Ralph, E. D. 1978. The bactericidal activity of nitrofurantoin and metronidazole against anaerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **4**: 177-184.
- Renneberg, J. & Walder, M. 1989. Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin, and amikacin in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1714-1720.
- Rescott, D. L., Nix, D. E., Holden, P. & Schentag, J. J. 1988. Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. *Agents Chemother.* **32**: 450-453.
- Reynolds, P. E. 1989. Structure, biochemistry and mode of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 943-950.
- Roberts, M. C., McFarland, L. V., Mullany, P. & Mulligan, M. E. 1994. Characterization of the genetic basis of antibiotic resistance in *Clostridium difficile*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**: 419-429.
- Rogers, H. J., Perkins, H. R. & Ward, J.B. 1980. Microbial cell walls and membranes. Chapman & Hall Ltd., London.
- Rotham, S. W., Brown, J. E., Diecidue, A. & Foret, D. A. 1984. Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **46**: 324-331.
- Rousseau, M., Hermier, J. & Bergere J.-L. 1971.a. Structure de certains *Clostridium* du groupe butyrique. I.- Sporulation de *Clostridium butyricum* et *Clostridium saccharobutyricum*. *Ann. Inst. Pasteur.* **120**: 23-32.
- Rousseau, M., Hermier, J. & Bergere J.-L. 1971.b. Structure de certains *Clostridium* du groupe butyrique. II.- Sporulation de *Clostridium tyrobutyricum*. *Ann. Inst. Pasteur.* **120**: 33-41.
- Rousseau, M., Hermier, J. & Bergere J.-L. 1971.c. Structure de certains *Clostridium* du groupe butyrique. III.- Rôle de la membrane dans la formation des tuniques: mise en évidence par l'analyse des formes anormales de sporulation. *Ann. Inst. Pasteur.* **121**: 3-12.
- Russel, A. D. 1990. Bacterial spores and chemical sporocidal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 99-119.
- Ryter, A. 1965. Étude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur.* **108**: 40-60.
- Sára, M. & Sleytr, U. B. 1987.a. Charge distribution on S-layer of *Bacillus stearothermo-philus* NRS 1536/3c and importance of charged groups for morphogenesis and function. *J. Bacteriol.* **169**: 2804-2809.

- Sára, M. & Sleytr, U. B. 1987.b. Molecular sieving through S layers of *Bacillus stearo-thermophilus* strains. *J. Bacteriol.* **169**: 4092-4098.
- Sára, M. & Sleytr, U. B. 1993. Relevance of charged groups for the integrity of the S-layer from *Bacillus coagulans* E38-66 and for molecular interactions. *J. Bacteriol.* **175**: 2248-2254.
- Schwan, A., Sjolín, S. Trottestam, U. & Aronsson, B. 1984. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand. J. Infect. Dis.* **16**: 211-215.
- Scopes, J. W., Smith, M. F. & Beach, R. C. 1980. Pseudomembranous colitis and sudden infant death. *Lancet* **1**: 1144.
- Sell, T. L., Schaberg, D. R. & Fekety, F. R. 1983. Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microb.* **17**: 1148-1152.
- Sharp, G. W. G. & Hynie, S. 1971. Simulation of intestinal adenylyclase by cholera toxin. *Nature.* **229**: 266-269.
- Sherertz, R. J. & Sarubbi, F. A. 1982. The prevalence of *Clostridium difficile* and toxin in a nursery population: a comparison between patients with necrotizing enterocolitis and an asymptomatic group. *J. Pediatr.* **100**: 435-439.
- Shockman, G. D. & Barrett J. F. 1983. Structure, function, and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 501-527.
- Siffert, J.-C., Baldacini, O., Kuhry, J.-G., Wachsmann, D., Benabdelmoumene, S., Faradji, A., Monteil, H. & Poindron, P. 1993. Effects of *Clostridium difficile* toxin B on human monocytes and macrophages: possible relationship with cytoskeletal rearrangement. *Infect. Immun.* **61**: 1082-1090.
- Silva, J. Jr., Tang, Y. J. & Gumerlock, P. H. 1994. Genotyping of *Clostridium difficile* isolates. *J. Infect. Dis.* **169**: 661-664.
- Silva, M. T. & Sousa J. C. F. 1972. Ultrastructural alterations induced by moist heat in *Bacillus cereus*. *Appl. Microbiol.* **24**: 463-476.
- Silva, M. T. & Sousa J. C. F. 1973. Ultrastructure of the cell wall and cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria with different fixation techniques. *J. Bacteriol.* **113**: 953-962.
- Silva, M. T. 1975. The ultrastructure of the membranes of the Gram-positive bacteria as influenced by fixatives and membrane-damaging treatments. *In* Biomembranes: Lipids, Proteins and Receptors. (Burton, R. M. & Packer, L., Eds) pp. 255-289. BI-Science Publ. Div., Webster Groves, Mo., USA.
- Silva, M. T. 1979. Características micromorfológicas e funcionais das membranas de Gram-positivo. Alterações induzidas por fixadores, substâncias muralíticas e agentes membrano-ativos. **Prova complementar de doutoramento em Microbiologia.** Universidade do Porto.
- Silva, M. T. 1984. The use of transmission electron microscopy of ultrathin sections for the characterization of the ultrastructure of normal and damage bacterial membranes. *In* Biomembranes: Dynamics and Biology (Guerra, F.C. & Burton, R.M., Eds) pp. 1-36. Plenum Press. New York.
- Silva, M. T., Sousa J. C. F. & Balassa, G. 1978. Ultrastructural effects of chemical agents and moist heat on *Bacillus subtilis*. 1- Effects on vegetative cells. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur).* **129 B**: 363-375.
- Silva, M. T., Sousa J. C. F., Macedo, M. A. E., Polónia J. J. & Parente A. M. 1976.a. Effects of phenethyl alcohol on *Bacillus* and *Streptococcus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1359-1369.
- Silva, M. T., Sousa J. C. F., Polónia J. J. & Macedo, P. M. 1979. Effect of local anesthetics on bacterial cells. *J. Bacteriol.* **137**: 461-468.

- Silva, M. T., Sousa J. C. F., Polónia J. J., Macedo, M. A. E. & Parente A.M. 1976.b. Bacterial Mesosomes. Real structures or artifacts? *Biochim. Biophys. Acta.* **443**: 92-105.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science.* **175**: 720-731.
- Sleytr, U. B. & Glauert A. M. 1975. Analysis of regular arrays on bacterial surfaces: evidence for a dynamic process of assembly. *J. Ultrastruct. Res.* **50**: 103-116.
- Sleytr, U. B. & Glauert A. M. 1976. Ultrastructure of the cell walls of two closely related *Clostridia* that possess different regular arrays of surface subunits. *J. Bacteriol.* **126**: 869-882.
- Sleytr, U. B. & Messner P. 1983. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 311-339.
- Sleytr, U. B. & Messner P. 1988. Crystalline surface layers in procaryotes. *J. Bacteriol.* **170**: 2891-2897.
- Sleytr, U. B. & Thorne, K. J.I. 1976. Chemical characterization of regularly arranged surface layers of *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* **126**: 377-383.
- Sleytr, U. B. 1976. Self-assembly of the hexagonally and tetragonally arranged subunits of bacterial surface layers and reattachment to cell walls. *J. Ultrastruct. Res.* **55**: 360-377.
- Smit, J., Engelhardt, H., Volker, S., Smith, S.H. & Baumeister W. 1992. The S-layer of *Caulobacter crescentus*: three-dimensional image reconstruction and structure analysis by electron microscopy. *J. Bacteriol.* **174**: 6527-6538.
- Sonnenfeld, E. M., Beveridge T.J., Koch, A. L. & Doyle, R. J. 1985. Asymmetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **163**: 1167-1171.
- Sousa, J. C. F. 1980. Estudo da morfogénese da esporulação do *Bacillus subtilis*. Prova complementar de doutoramento em Microbiologia. Universidade do Porto.
- Sousa, J. C. F., Costa, P. P., Bravo, F., Figueira, A. S., Silva, N. T. & Silva, M. T. 1976. Isolation and characterization of the top-layer of *Sporosarcina ureae*. XI Reunião Anual da Sociedade de Microscopia Electrónica, Lisboa.
- Stalons, D. R., Thornsberry, C. & Dowell, V. 1974. *Appl. Microbiol.* **27**: 1098-1104
- Stark, P. L., Lee, A. & Parsonage, B. D. 1982. Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants: quantitative study. *Infect. Immun.* **35**: 895-899.
- Steinberg, J. P., Beckerdite, M. E. & Westenfelder, G. O. 1987. Plasmid profiles of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated colitis in two community hospitals. *J. Infect. Dis.* **156**: 1036-1038.
- Strominger, J. L. & Birge, C. H. 1965. Nucleotide accumulation induced in *Staphylococcus aureus* by glycine. *J. Bacteriol.* **89**: 1124-1127.
- Sullivan, N. M., Pellet, S. & Wilkins, T. D. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **35**: 1032-1040.
- Surawicz, C. M., Elmer, G. W., Speelman, P., McFarland, L. V., Chin, J. & Van Belle, G. 1989.a. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* a prospective study. *Gastroenterology.* **96**: 981-988.
- Surawicz, C. M., McFarland, L. V., Elmer, G. W. & Chin, J. 1989. b. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. *Am. J. Gastroenterol.* **84**: 1285-1287.

- Swanson, R. N., Hardy, D. J., Schipkowitz, N.L., Hanson, C. W., Ramer, N. C., Fernandes, P. B. & Clement, J. J. 1991. In vitro and in vivo evaluation of tiacumicins B and C against *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1108-1111.
- Tabaqchali, S. 1990. Epidemiologic markers of *Clostridium difficile*. *Rev. Infect. Dis.* **12** (Suppl. 2): S192-S199.
- Tabaqchali, S., O'Farrel, S., Holland, D. & Silman, R. 1984. Typing scheme for *Clostridium difficile*: its application in clinical and epidemiological studies. *Lancet* **1**: 935-938.
- Takeoka, A., Takumi, K., Tetsuro K. & Kawata, T. 1991. Purification and characterization of S-layer proteins from *Clostridium difficile* GAI 0714. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 261-267.
- Takumi, K., Susami, Y., Takeoka, A., Oka, T. & Koga, T. 1991. S-layer protein of *Clostridium tetani*: purification and properties. *Microbiol. Immunol.* **35**: 569-575.
- Takumi, K., Takeoka, A. & Kawata, T. 1983. Purification and characterization of a wall protein antigen from *Clostridium botulinum* type A. *Infect. Immun.* **39**: 1346-1353.
- Takumi, K., Takeoka, A. & Kawata, T. 1987. Purification and immunochemical properties of a wall protein antigen from *Clostridium difficile* ATCC 11011. *Microbiol. Immunol.* **31**: 837-849.
- Tally, F. P., Goldin, B. R., Sullivan, N., Johnston, J. & Gorbach, S. L. 1978. Antimicrobial activity of metronidazole in anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 460-465.
- Taylor, N. S., Thorne, G. M. & Bartlett, J. G. 1981. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **34**: 1036-1043.
- Teasley, D. G., Olson, M. M., Gebhard, R. L., Gerding, D. N., Peterson, L. R., Schwartz, M. J. & Lee Jr, J.T. 1983. Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile* associated-diarrhoea and colitis. *Lancet* **2**: 1043-1046.
- Thiéry, J. P. & Rambourg, 1974. Cytochimie des polysaccharides. *J. Microscopie* **21**: 225-232.
- Thiéry, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* **6**: 987-1018.
- Toma, S., Lesiak, G., Magus, M., Lo, H.-L. & Delmée, M. 1988. Serotyping of *Clostridium difficile*. *J Clin. Microb.* **26**: 426-428.
- Toothaker, R. D. & Elmer, G. W. 1984. Prevention of clindamycin-induced mortality in hamstres by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**: 552-556.
- Tsuboi, A., Tsukagoshi, N. & Uduka S. 1982. Reassembly in vitro of hexagonal surface arrays in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* **151**: 1485-1497.
- Tsui, S. Y. T., Yew, W. W., Li, M. S. K., Chan, C. Y. & Cheng, A. F. B. 1993. Postantibiotic effects of amikacin and ofloxacin on *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 1001-1003.
- Tsutaoka, B., Hansen, J., Johnson, D. & Holodniy, M. 1994. Antibiotic-associated pseudomembranous enteritis due to *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.* **18**: 982-984.
- Tucker, K. D. & Wilkins T. D. 1991. Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.* **59**: 73-78.
- Tucker, K. D., Carrig, P. E. & Wilkins T. D. 1990. Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. *J. Clin. Microb.* **28**: 869-871.

- Tylewska, S., Hjertén, S & Wadstrom, T. 1981. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on the adhesion of *Streptococcus pyogenes* to pharyngeal epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 563-566.
- Van der Auwera, P. 1991. Interactions between antibiotics and phagocytosis in bacterial killing. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 74: 42-48.
- Viscidi, R. P., Willey, S. & Bartlett, J. G. 1981. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology.* 81: 5-9.
- Vogelman, B. S. & Craig, W. A. 1985. Postantibiotic effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 15(Suppl. A): 37-46.
- Vogelman, B. S., Gudmundsson, S., Leggett, J., Turnidge, J., Ebert, S. & Craig, W. A. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.* 158: 831-847.
- Vosbeck, K., Mett, H., Hubber, U., Bohn, J. & Petignat, M. 1982. Effect of low concentrations of antibiotics on *Escherichia coli* adhesion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 864-869.
- Wada, N., Nishida, N., Iwaki, S., Ohi, H., Miyawaki, T., Taniguchi, N. & Migita, S. 1980. Neutralizing activity against *Clostridium difficile* toxin in the supernatants of cultured colostrical cells. *Infect. Immun.* 29: 545-550.
- Waldburger, C., Gonzalez, D. & Chambliss, G. H. 1993. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175: 6321-6327.
- Walker, S. G., Smith, S. H. & Smit, J. 1992. Isolation and comparison of the paracrystalline surface layer proteins of freshwater *Caulobacter*. *J. Bacteriol.* 174: 1783-1792.
- Ward, J.B. 1981. Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly and location. *Microbiol. Rev.* 45: 211-243.
- Warth, A. D. & Strominger, J. L. 1969. Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: occurrence of the lactam of muramic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 64: 528-535.
- Whittier, S., Shapiro, D.S., Kelly, W.F., Walden, T.P., Wait, K.J., McMillon, L.T. & Gilligan, P.H. 1993. Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *J. Clin. Microb.* 31: 2861-2865.
- Wicken, A. J. & Knox, K. W. 1975. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigens. *Science.* 187: 1161-1167.
- Wicken, A. J. & Knox, K. W. 1980. Bacterial cell surface amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta.* 604: 1-26.
- Wientjes, F. B. & Nanninga, N. 1991. On the role of the high molecular weight penicillin-binding proteins in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 142: 333-344.
- Wilson, K. H. & Perini, F. 1988. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect. Immun.* 56: 2610-2614.
- Wilson, K. H., Kennedy, M. J. & Fekety, F.R. 1982. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microb.* 15: 443-446.
- Wolfhagen, M. J. H. M., Fluit, A. C., Torensma, R., Jansze, M., Kuypers, A. F. A., Verhage, E. A. E. & Verhoef, J. 1993. Comparison of typing methods for *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microb.* 31: 2208-2211.

- Wren, B. W., Clayton, C. L., Castledine, N. B. & Tabaqchali. 1990. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* strains by using a toxin A gene-specific probe. *J. Clin. Microb.* **28**: 1808-1812.
- Wust, J., Sullivan, N. M., Hardegger, U. & Wilkins T. D. 1982. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *J. Clin. Microb.* **16**: 1096-1101.
- Wyrick, P. B. & Rogers, H. J. 1973. Isolation and characterization of cell wall-defective variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **116**: 456-465.
- Yagi, B. H., Schaadt, R. D. & Zurenko, G. E. 1992. The bactericidal activity and postantibiotic effect of trospectomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 417-423.
- Yolton, D. P., Pope, L., Williams, M. G. & Rode, L. J. 1968. Further electronmicroscope characterization of spore appendages of *Clostridium bifermentans*. *J. Bacteriol.* **95**: 231-238.

Anexo

TABELA A. Presença de *C. difficile* em fezes de recém-nascidos saudáveis atendidos em hospital. Serviço de Pediatria, Hospital S. João, Porto.

NºDoente	NºAmostra	Idade (dias)	Pesquisa <i>C. difficile</i> (designação estirpe)	Tipo de alimentação
1	1ª	7d	Neg	LM
	2ª	30d	POS*	LM
	3ª	60d	POS*	LM
	4ª	270d	Neg	LI
4	1ª	1d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	60d	POS*	LI
	4ª	75d	POS*	LI
	5ª	120d	POS*	LI
5	1ª	2d	Neg	LM
	2ª	60d	Neg	LM
	3ª	90d	Neg	
	4ª	120d	POS*	
	5ª	150d	Neg	
6	1ª	8d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	60d	Neg	LM
	4ª	90d	Neg	
	5ª	120d	Neg	
7	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM/LI
	3ª	75d	Neg	LM/LI
	4ª	120d	Neg	
8	1ª	5d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	60d	Neg	LM
	4ª	270d	Neg	
11	1ª	7d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM/LI
	3ª	105d	POS (CD11)	
12	1ª	8d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
13	1ª	8d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM/LI
	3ª	105d	POS*	LI
20	1ª	3d	Neg	LM
23	1ª	6d	Neg	LM

24	1ª	7d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	60d	Neg	
27	1ª	7d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	90d	Neg	
34	1ª	5d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	120d	Neg	
35	1ª	25d	Neg	LM/LI
36	1ª	7d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
37	1ª	10d	Neg	LM
	2ª	30d	POS*	
	3ª	90d	Neg	
	4ª	240d	Neg	
38	1ª	11d	Neg	LM
39	1ª	9d	Neg	LM
40	1ª	11d	POS*	LM
41	1ª	11d	POS (CD41)	LM
	2ª	180d	Neg	
42	1ª	150d	Neg	LI
43	1ª	10d	Neg	LM
44	1ª	120d	POS*	LI
45	1ª	11d	Neg	
46	1ª	11d	Neg	
	1ª	11d	Neg	
	1ª	11d	Neg	
47	1ª	11d	Neg	
	2ª	30d	Neg	
	3ª	49d	Neg	
48	1ª	11d	Neg	
49	1ª	11d	Neg	
	2ª	30d	Neg	
50	1ª	11d	Neg	

POS* = estirpes não utilizadas neste trabalho; LM = leite materno; LI = leite industrial

TABELA B. Presença de *C. difficile* em fezes de recém-nascidos saudáveis atendidos em consultório.

NºDoente	NºAmostra	Idade (dias)	Pesquisa <i>C.difficile</i> (designação estirpe)	Tipo de alimentação
1	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	LM
	3ª	70d	Neg	LM
	4ª	100d	Neg	LI
2	1ª	11d	ND	LM
	2ª	30d	Neg	LI
	3ª	60d	Neg	LI
	4ª	90d	POS (CD24)	LI
	5ª	130d	Neg	LI
3	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	40d	Neg	LM/LI
	3ª	100d	POS (CD34)	LI
4	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	40d	Neg	LM
	3ª	70d	Neg	LI
	4ª	100d	POS*	LI
5	1ª	11d	POS (CD50)	LM
	2ª	40d	Neg	LI
	3ª	70d	Neg	LI
	4ª	100d	Neg	LI
	5ª	140d	POS (CD55)	LI
6	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	40d	Neg	
	3ª	50d	Neg	LM/LI
	4ª	80d	Neg	
	5ª	130d	Neg	LM/LI
	6ª	140d	Neg	
7	1ª	11d	Neg	LI
	2ª	30d	Neg	LI
	3ª	60d	Neg	LI
	4ª	90d	Neg	LI
	5ª	130d	POS (CD74)	LI
8	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	
	3ª	60d	Neg	LM/LI
	4ª	90d	Neg	LM/LI
9	1ª	11d	Neg	LM
	2ª	30d	Neg	
	3ª	60d	Neg	LM/LI
	4ª	120d	Neg	
	5ª	126d	Neg	

10	1ª	11d	Neg		LM
	2ª	30d	Neg		LM
	3ª	70d	Neg		
	4ª	130d	Neg		
55		11d	Neg		
56		11d	POS	(CD56)	
64		11d	Neg		
146	1ª	60d	Neg		LM
	2ª	110d	POS	(CD146)	
147	1ª	14d	Neg		LM
	2ª	90d	POS	(CD147)	LM
148	1ª	30d	POS	(CD148)	LI
	2ª	100d	Neg		LI
149	1ª	30d	Neg		LI
	2ª	120d	Neg		LI

POS* = estirpes não utilizadas neste trabalho; LM = leite materno; LI = leite industrial

TABELA C. Presença de *C.difficile* em fezes de crianças, submetidas a antibioterapia, provenientes de uma unidade de cuidados intensivos. Serviço de Pediatria, Hospital S.João, Porto.

Nº Doente	Nº Amostra	Idade (dias)	Pesquisa <i>C.difficile</i> (designação estirpe)	Dados clínicos	Antibióticos em curso
1		8d	POS (CD1)	Colite pseudo-membranosa	Amp/Netil
2		8d	POS (CD2)		Amp/Netil
3		8d	Neg	Enterocolite	
9		5d	Neg		Peni/Netil
10		19d	Neg		Imipen/Vanco
14		135d	Neg	Diarreia, otite	Amp
15		13d	Neg	Sépsis, onfalite	Diclox /Netil
16		17d	Neg	Sépsis	Amp/Cftx
17		2d	Neg		Peni/Netil
18	1ª	2d	Neg		Peni/Netil
	2ª	30d	Neg		Vanc/Cftx
19	1ª	6d	Neg	NEC	Peni/Netil
	2ª	22d	Neg		Vanc/Cftx/Metro
	3ª	45d	Neg		Vanc/Amp
21		180d	Neg	Gastrenterite	Amp
25		18d	Neg	Sépsis	Ceftx/Netil
29	1ª	3d	Neg	Sépsis	Peni/Netil
	2ª	10d	Neg		Impen
31	1ª	3d	Neg		Amp/Netil /Cftx
	2ª	30d	Neg		
	3ª	45d	POS*		
	4ª	60d	POS*		
32		19d	Neg		Peni/Netil
33		23d	Neg		Amp/Netil
77		10d	Neg		Amp/Cftx/Vanco/ Imipen
78		60d	Neg		Peni/Netil/Cftx/ Netil/Amic/ Imipen/Vanco/
79		12d	Neg		Peni/Netil

80		19d	Neg		Cftx/Netil
81		20d	Neg		Cftx/Metro
82		1d	Neg		
83		45d	Neg		Amp/Netil
84		6d	Neg		Peni/Netil
85		4d	Neg		
86		10d	Neg		Cftx
87	1 ^o	4d	Neg		Amp/Netil
	2 ^a	28d	Neg		Vanco
88	1 ^a	2d	Neg		Amp/Netil
	2 ^a	10d	Neg		Amp/Cftx/MetrOS
89	1 ^a	21d	Pos	(CD89)	Cftx/Netil
	2 ^a	24d	Neg		Cftx/Netil
90		3d	Neg		Netil/Amp/Cftx/ Vanco
91		7d	Neg		Cftx/Netil
92		3d	Neg		Peni/Netil
93		2d	Neg		Peni/Netil
94		1d	Neg		
95		14d	Neg		Amp/Netil
96		20d	Neg		Amp/Netil
97	1 ^a	2d	Neg		Peni/Netil
	2 ^a	21d	Neg		
	3 ^a	27d	Neg		Amp/Cftx/Vanco
98		13d	Neg		Amp/Cftx/Eritr
99		10d	Neg		Amp/Cftx
100	1 ^a	10d	Neg		Amp/Cftx
	2 ^a	12d	Neg		Amp/Cftx
101	1 ^a	2d	Neg		Peni/Netil
	2 ^a	14d	Neg		Cftx/Amic/Vanco
	3 ^a	30d	Neg		
	4 ^a	45d	Neg		
	5 ^a	75d	Neg		
	6 ^a	90d	POS	(CD101)	
102		11d	Neg		Cftx/Netil
103		12d	Neg		Amp/Cftx

104	1ª 2ª	4d 6d	Neg Neg		Peni/Netil Peni/Netil/Vanco
105		3d	Neg		Peni/Netil
107	1ª 2ª 3ª 4ª 5ª 6ª	1d 7d 14d 41d 43d 48d	Neg POS* Neg Neg Neg Neg	 NEC	Amp/Netil Imipen/Vanco/Amp/ Netil Cftx/Metro
108		3d	POS*	NEC	Amp/Netil/Metro
109		1d	Neg	Sépsis	Amp/Netil
110		3d	Neg	Cardiopatia	
111		11d	POS*		Amp/Cftx
112		1d	Neg	Sépsis	Amp/Netil
113		1d	Neg	Hidronefrose	Amp/Netil
114		2d	Neg	Sépsis	Amp/Netil
115		4d	Neg	Pneumonia Sépsis	Amp/Netil
116		7d	Neg		Amp/Netil
117		3d	Neg	Sépsis	Peni/Netil
118	1ª 2ª 3ª 4ª	6d 9d 45d 60d	Neg Neg Neg POS*	Sífilis	Peni/Netil Peni/Netil Imipenem
119		6d	Neg	Sépsis	Amp/Netil
120		1d	Neg	Epidermólise bulhosa	Diclox
121		2d	Neg		Amp/Netil
122	1ª 2ª 3ª	1d 14d 30d	Neg Neg Neg		
123		8d	Neg		Peni/Netil
124		2d	Neg	Sépsis	Vanco/Cftx
125		2d	Neg	Sépsis	Amp/Netil
126		4d	Neg	Sépsis	Peni/Netil
127		2d	Neg	Sépsis	Amp/Netil

128		1d	Neg	Hidrocefalia	
129		9d	Neg		Amp/Netil
130		1d	Neg	Sépsis	Amp/Netil
131		5d	Neg		
132		2d	Neg		Amp/Netil
133	1 ^a	2d	Neg		Amp/Netil
	2 ^a	11d	Neg		
	3 ^a	17d	Neg		
	4 ^a	23d	Neg		Amp/Cftx
	5 ^a	37d	Neg		
134		1d	Neg		
135		1d	Neg		
136		1d	Neg	SDR	
137		3d	Neg		Peni/Netil
138		4d	Neg		
139		4d	Neg		
140	1 ^a	16d	Neg		Vanco/Netil
	2 ^a	22d	Neg		
141	1 ^a	9d	Neg		Amp/Netil
	2 ^a	30d	Neg		Vanco
142		1d	Neg		
143		4d	Neg		
144		4d	Neg		
145		5d	POS	(CD145)	Amp/Cftx
146		5d	Neg		Amp/Cftx
147		2d	Neg		Amp/Netil
148		2d	Neg		
149		1d	Neg		
150		12d	Neg		
151		1d	Neg		
152		2d	Neg		Peni/Netil
153		1d	Neg		Amp/Netil
154		3d	Neg		Amp/Netil

155		2d	Neg	
156		1d	Neg	Amp/Netil
157		3d	Neg	Amp/Netil
158		5d	Neg	
159		2d	Neg	Amp/Netil
160		4d	POS*	
161		5d	Neg	
162		17d	Neg	Cftx/Amp
163	1 ^a	11d	Neg	Amp/Netil/Metro
	2 ^a	30d	Neg	
164		11d	Neg	
165		11d	Neg	Cftx/Vanco
171	1 ^a	11d	Neg	
	2 ^a	30d	Neg	

POS*=estirpes não utilizadas neste trabalho.

Amp=ampicilina; Amic=amicacina; Cftx=cefotaxima; Diclox=dicloxacilina; Eritro=eritromicina;
 Imipen=imipenemo; Metro=metronidazol; Netil=netilmicina; Peni=penicilina; Vanco=vancomicina

NEC=enterocolite necrosante

SDR=síndrome de deficiência respiratória

TABELA D. Presença de *C. difficile* em fezes de crianças com doença hematológica maligna. Serviço de Pediatria, Hospital S.João, Porto.

Nº Doente	Nº Amostra	Idade	Pesquisa <i>C. difficile</i> (designação estirpe)	Dados clínicos	Antibióticos em curso
22	1ª	33.5m	POS (CD22)	LLA	SXT/Nistat
	2ª	34.5m	Neg		Ctrmx/Nistat
	3ª	35m	Neg		Ctrmx/Nistat
26	1ª	18.5m	Neg	LLA	Ctrmx/Nistat
	2ª	19.5m	POS (CD26)		Cftx/Amic
	3ª	20.5m	Neg		
28	1ª	89.5m	Neg	LLA	SXT/Amic/Cftrx
	2ª	90.5m	Neg		Ctrmx
30		13m	Neg	Hepatoesple- nomegalia	Cftrx/Amic
51	1ª	7.5m	Neg	LLA	SXT/Nistat
	2ª	9m	Neg		Nistat/Ctrmx
	3ª	17m	Neg		
52	1ª	32m	Neg	Linfoma	Cft/Netil
	2ª	41m	Neg		
53		103m	Neg	Linfoma Burkitt	Ctrmx/Cftrx
54		101m	Neg	LLA	
55		1.5m	Neg	LLA	Cftrx/Amic
56		48m	Neg	LLA	
57		2m	Neg		Ctrmx/Nistat
58		48.5m	Neg	LLA	Ctrmx/Cftrx Amic/SXT
59		22m	Neg	Linfoma	SXT
60	1ª	9m	Neg	Neuroblastoma	Ctrmx
	2ª	9.5m	POS (CD60)		
61	1ª	36m	POS*	LLA	Ctrmx/SXT
	2ª	36.5m	Neg		Cftrx/Amic
62	1ª	9m	Neg		Ctrmx/Nistat
	2ª	15m	Neg		Vinc/Dauno
	3ª	15.5m	Neg		Cftx

63	49m	Neg		Ctrmx/Nistat Cftrx/Amic
64	9m	POS*	Quimioterapia radioterapia	
65	29m	Neg		Ctrmx

POS*=estirpes não utilizadas neste trabalho.

Amic=amicacina; Cft=cefoxitina; Cftx=cefotaxima; Cftrx=ceftriaxone; Ctrmx=cotrimoxazol; Nistat=nistatina; SXT=trimetropim-sulfametoxazol; Dauno=daunomicina; Nistat=nistatina; Vinc=vincristina

LLA=leucemia linfocítica aguda

TABELA E. Capacidade de produção de toxina A e susceptibilidade (CIM) à vancomicina e ao metronidazol apresentada pelas 19 estirpes de *C. difficile* isoladas das fezes de crianças.

Designação da estirpe	Produção toxina A	CIM (mg/L)	
		Vancomicina	Metronidazol
CD1	+	0.75	0.19
CD2	-	0.75	0.125
CD11	-	0.50	0.19
CD22	-	0.75	0.125
CD24	-	0.75	0.19
CD26	-	0.50	0.25
CD34	-	0.75	0.25
CD41	-	0.50	0.19
CD50	-	0.50	0.19
CD55	-	0.75	0.25
CD56	+	0.50	0.19
CD60	+	0.50	0.19
CD74	-	0.50	0.19
CD89	+	0.50	0.19
CD101	-	0.50	0.125
CD145	+	0.50	0.25
CD146	-	0.75	0.25
CD147	-	0.75	0.125
CD148	-	0.75	0.19