



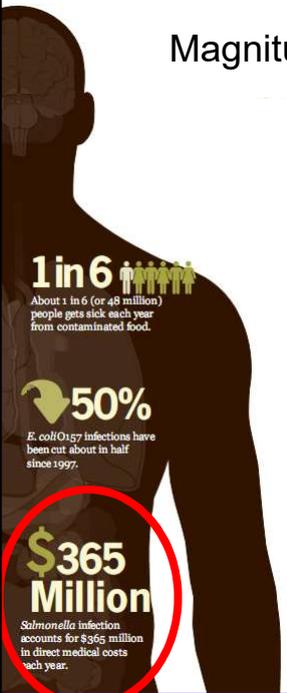
Universidade de São Paulo
Brasil

FBA 0435 – Enfermidades Microbianas de Origem Alimentar

Salmonella spp.

Prof. Uelinton Pinto
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
uelintonpinto@usp.br

Magnitude das doenças de origem alimentar



- 2 a 4 bilhões de diarreias infecciosas anualmente.
- Morbidade e mortalidade - OMS - doenças diarreicas agudas - > 2 milhões óbitos/ano
- Principal causa: **água e alimentos contaminados**
- Países industrializados – diarreia contribui para morbidade.
- Países em desenvolvimento – causa mortalidade (crianças <5 anos)

1 in 6 
About 1 in 6 (or 48 million) people gets sick each year from contaminated food.

50%
*E. coli*O157 infections have been cut about in half since 1997.

\$365 Million
Salmonella infection accounts for \$365 million in direct medical costs each year.

Magnitude das doenças de origem alimentar

- ❑ Terapia de re-hidratação contribuiu para diminuir mortalidade

Outras conseqüências:

- ❑ Absorção de nutrientes é prejudicada → diminui crescimento das crianças, diminui aptidão física, **prejudica desenvolvimento cognitivo e aprendizagem!**

DIARRÉIA

Desbalanço na absorção e secreção de íons e solutos através do epitélio intestinal seguido de movimentação de água para o lúmem.

Nature Reviews Microbiology | AOP, published online 31 December 2008; doi:10.1038/nrmicro2053

Gut Microbes 1:1, 4-21; January/February 2010; © 2010 Landes Bioscience

Quem são os principais vilões?

De todos os casos com agentes identificados:

- **Norovirus → 58%**
- **Salmonella spp. 11%,**
- **Clostridium perfringes 10%**
- **Campylobacter spp. em 9%.**

Dos 55.961 hospitalizados

Mas quando se fala em hospitalizações:

1. **Salmonella spp. (35%),**
2. Norovirus (26%),
3. *Campylobacter* spp. (15%)
4. *Toxoplasma gondii* (8%)

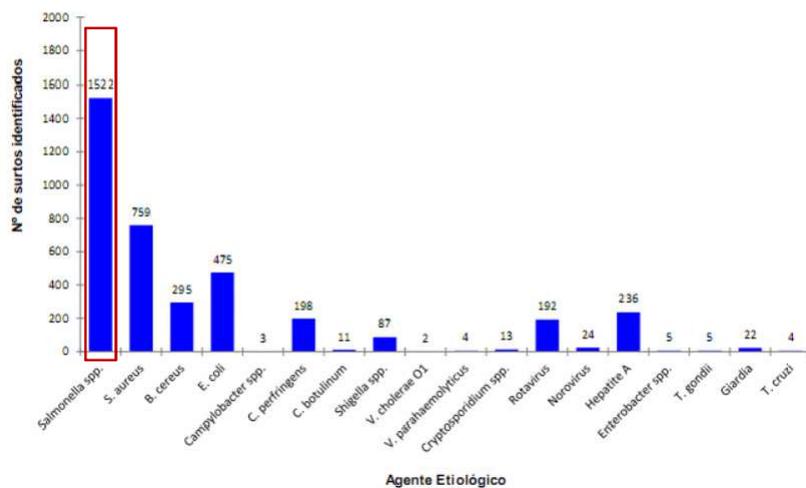
Das 1351 mortes

Quando se fala em óbitos:

1. **Salmonella spp. (28%),**
2. *T. gondii* (24%),
3. *L. monocytogenes* (19%),
4. Norovirus (11%)
5. *Campylobacter* spp. (6%)

(SCALLAN et al., 2011b).

Número de surtos por agente etiológico.
Brasil, 2000-2013*



BACTÉRIAS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Escherichia coli*

CARACTERÍSTICAS GERAIS

Micro-organismos em forma de bastonetes, Gram negativos, anaeróbios facultativos.

Habitat: Trato intestinal de animais e o homem.

***Salmonella* – bastonetes móveis (0.7–1.5 a 2.0–5.0 μm), flagelos peritríquios**

CARACTERÍSTICAS GERAIS

TEMPERATURA

- ✓ 5 a 47 °C (ótima entre 35 a 37 °C)
- ✓ Refrigeração: a maioria não se multiplica
- ✓ Sobrevivem por longos períodos sob congelamento
- ✓ Termossensíveis (pasteurização é suficiente)

pH

- ✓ 4,5 a 9,5 (6,5 a 7,5)

Depende do ácido utilizado

Aw

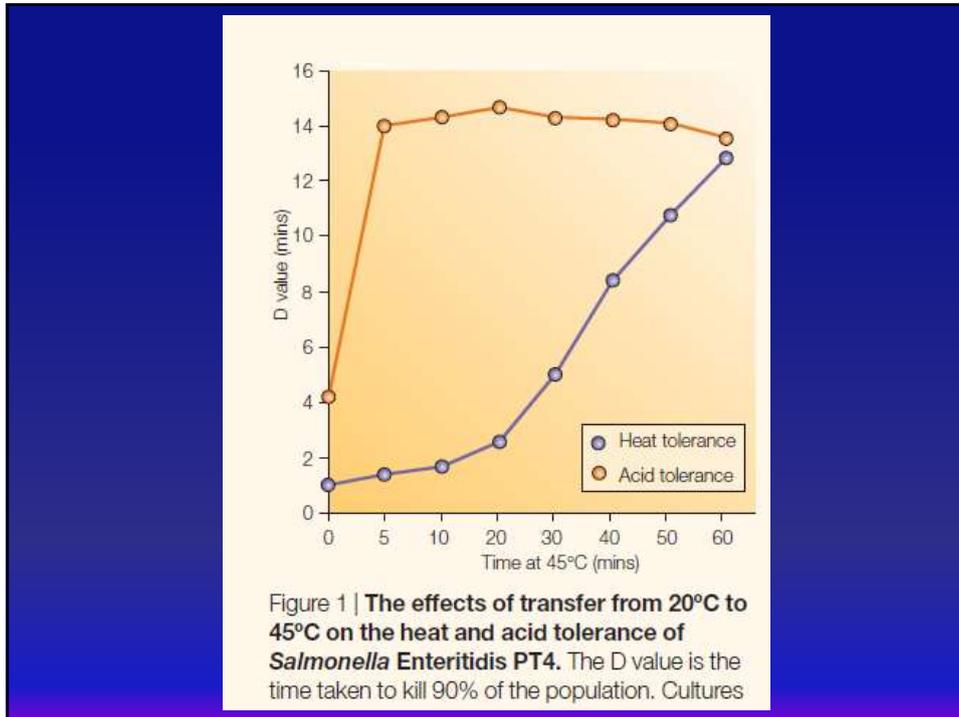
- ✓ 0,94 a >0,99
- não multiplica em Aw < 0,93

Efeito do ácido na inibição do crescimento

Table 26–2 Minimum pH at Which Salmonellae Would Initiate Growth under Optimum Laboratory Conditions

<i>Acid</i>	<i>pH</i>
Hydrochloric	4.05
Citric	4.05
Tartaric	4.10
Gluconic	4.20
Fumaric	4.30
Malic	4.30
Lactic	4.40
Succinic	4.60
Glutaric	4.70
Adipic	5.10
Pimelic	5.10
Acetic	5.40
Propionic	5.50

Jay – 7th edition



Long-term Survival of *Salmonella* in Foods with Low a_w

Product	Serotype	Inoculum (log CFU/g)	a_w	Temp (°C)	Length of survival	Reference
Milk chocolate	Eastbourne	5	0.38	20	9 mo	Tamminga <i>et al.</i> , 1976
		8	0.41	20	>9 mo	
Halva	Enteritidis	7	0.18	6, 8-20	>8 mo	Kotzekidou, 1998
Black pepper	Rubislaw	5	0.66	5, 25, 35	>15 d	Restori <i>et al.</i> , 2007
Almonds	Enteritidis	7		-20, 4, 23	>550 d 161 d	Uesugi <i>et al.</i> , 2006
Pecans	Agona, Enteritidis, Oranienberg, Sundsvall, Tennessee	2.5-4.5	0.53-0.63	-20, 4, 21, 37	>36 wk	Beuchat (not published)

http://www.foodprotection.org/files/rr_presentations/RR_06.pdf
Almonds – amendoas; pecan - noz

Salmonella

Primeiro caso confirmado em laboratório – 1888 – carne bovina implicada.

A mesma bactéria foi isolada de órgãos do paciente e da carne ingerida. *Bacterium enteritidis*

O nome *Salmonella* só ficou amplamente aceito da década de 60 em diante.

Salmonella

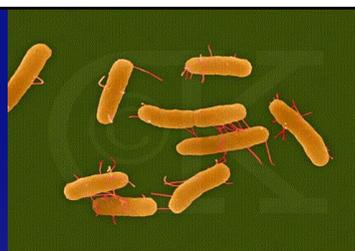
Duas espécies: *Salmonella enterica*

Salmonella bongori

S. enterica é dividida em 6 sub-espécies

- *enterica* (I)
- *salamae* (II)
- *arizonae* (III)
- *diarizonae* (IIIb)
- *houtenae* (IV)
- *indica* (VI)

Espécie e subespécie em itálico.



Differential characters of *Salmonella* species and subspecies

Species	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Subspecies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartarate ^(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ -glutamyltransferase	+	+	-	+	+	+	+
β -glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals		Cold-blooded animals and environment				

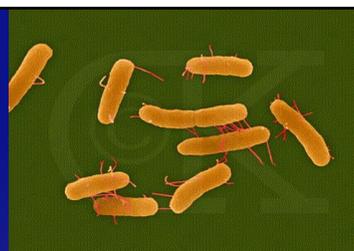
(a) = *d*-tartarate.

(*) = Typhimurium d, Dublin -.

+ = 90 % or more positive reactions.

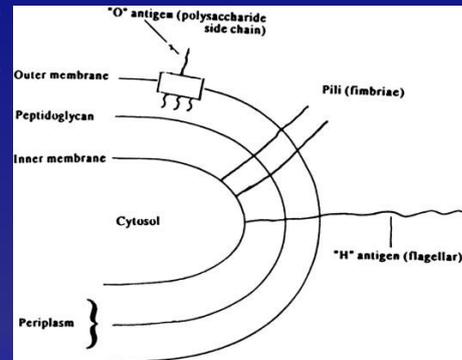
- = 90 % or more negative reactions.

d = different reactions given by different serovars.

L. Le Minor, M. Véron, M. Popoff. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1982, 133 B, 223-243 and 245-254.L. Le Minor, M.Y. Popoff, B. Laurent, D. Hermant. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 1986, 137 B, 211-217.**Salmonella****Mais de 2.650 Sorotipos****Sorotipo NÃO é em itálico e a primeira letra é maiúscula.****Ex.: *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ou simplesmente *Salmonella Typhimurium*****Não é recomendado usar a abreviação *S. Typhimurium*****Habitat: Trato intestinal de animais pássaros, répteis, gado, homem e ocasionalmente insetos.**

Sorotipos

- As estirpes de *Salmonella* são distinguíveis antígenicamente por aglutinação com soros homólogos e as combinações dos antígenos de cada estirpe.
- O – somático (polissacarídeo),
H – flagelar (proteína)
- + de 2650 sorotipos
- Para *E. coli* + de 200 estirpes do sorotipo O e 30 do H.



* tipagem com fagos e técnicas de biologia molecular

Particularidades sobre os sorotipos

Hospedeiro específicos

- *S. Gallinarum* → aves
- *S. Choleraesuis* → suínos
- *S. Typhi* and *S. Paratyphi A* → humanos

Hospedeiros adaptadas

Algumas podem infectar tanto animais quanto o homem → *S. Dublin* (gado e homens)

Hospedeiros diversos (ubiquitários)

→ *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*.

Síndromes causadas por *S. enterica*

Febre tifóide, paratifóide e gastroenterite

- **Febre tifóide: febre alta, anorexia, indisposição, convulsões, delírio, manchas rosadas.**
- **bacteremia: *Salmonella enterica* Sorotipo Typhi – *Salmonella* Typhi**
- **Período de incubação usualmente de 7 a 28 dias**
- **Duração: 1 a 8 semanas**

Febre tifóide - *Salmonella* Typhi

Contágio: ingestão de água e alimentos contaminados. Condições sanitárias e de higiene precárias. Contato pessoa-pessoa

Doença infecciosa aguda e sistêmica

Dose infectante: 10^3

Gravidade variável

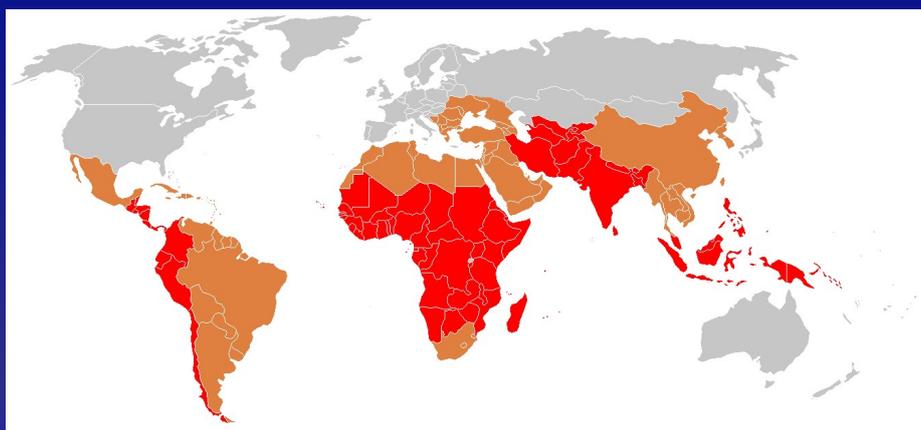
Mortalidade:

10-20%: casos não tratados

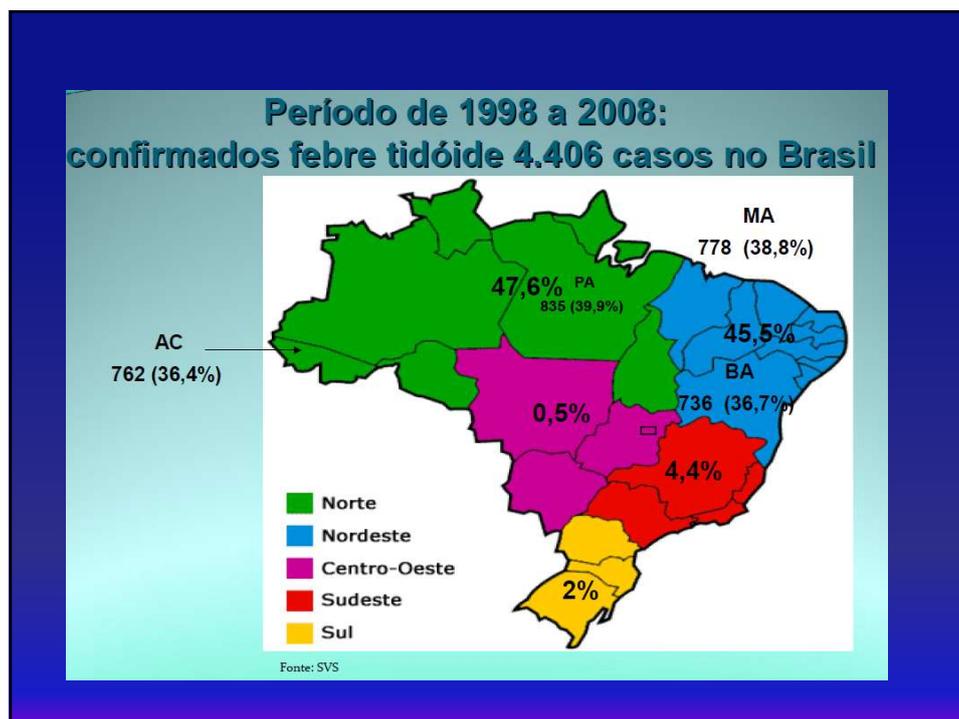
< 1%: tratamento com antibióticos (cloranfenicol, ampicilina ou trimetropin-sulfametoxazol)

- 2 a 5% infecções tifóides não tratadas resultam no portador crônico.
- Caso da Mary Typhoid -
<http://www.radiolab.org/story/169879-patient-zero/>
- <http://www.scielo.br/pdf/csp/v14n4/0214.pdf>
- A febre paratifóide é semelhante a tifóide, porém mais branda

A febre tifóide é endêmica em países em desenvolvimento

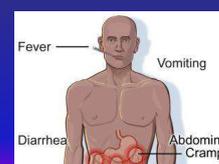


http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Fievre_typhoide.png



Gastroenterite - Salmonelose

- **Nauseas, vômito, diarréia, dores abdominais, febre:**
- normalmente sorotipos de *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Newport
- Período de incubação usual de 12 a 36 h.
- Duração de 2 a 3 dias
- Mortalidade baixa
- Autolimitada (tratamento suporte)



Gastroenterite - Salmonelose

- **Dose infectante: 10-10⁷ UFC**
 - Crianças, idosos e imunodeprimidos: doença severa
 - Corrente sanguínea → infecções extraintestinais: septicemia, eritema nodoso, meningite, etc

Table 1 | **Estimates of the infective dose of *Salmonella* spp.**

Foodstuff	Serovar	Infectious dose (CFU)
Cheese	Typhimurium	1–10
Chocolate	Eastbourne	<100
	Napoli	10–100
	Typhimurium	10
Maize snack	Agona	2–45
Paprika-flavoured potato chips	Saint Paul, Javiana, Rubislaw	<45
Peanut butter	Mbandaka	10–100

Derived from epidemiological evidence of outbreaks. CFU, colony-forming units. Data taken from REF. 43.

Patogênese

Ilhas de patogenicidade (SPI):

- Codificam fimbriaes, facilitam invasão nas células M
- Prevenção da fusão das vesículas com os lisossomos
- Células se multiplicam em vacúolos ligados a membrana
- Induzem apoptose nos macrófagos
- Células espalham
- Enterotoxinas são produzidas, mas real contribuição não foi elucidada

SPI

- **Genes necessários para invasão das células epiteliais;**
- **Resposta inflamatória;**

SPII

- Sobrevivência intracelular;
- Estabelecimento de infecção extraintestinal

→ Ambas as ilhas codificam sistemas de secreção do tipo III.

Maiores surtos

1. 1994 – 224 mil → sorvete
2. 1994 – 200 mil → ovos
3. 1985 – 200 mil → leite 2%

<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199605163342001>

Jay – 7th edition

Epidemiologia

- ✓ Amplamente distribuída na natureza
- ✓ Habitat primário: trato intestinal de animais e do homem
- ✓ Excreção nas fezes por portadores ou pessoas infectadas por até 3 meses dependendo do sorotipo

COMO REDUZIR AS DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR?

QUAIS SÃO AS PRIORIDADES E ESTRATÉGIAS?

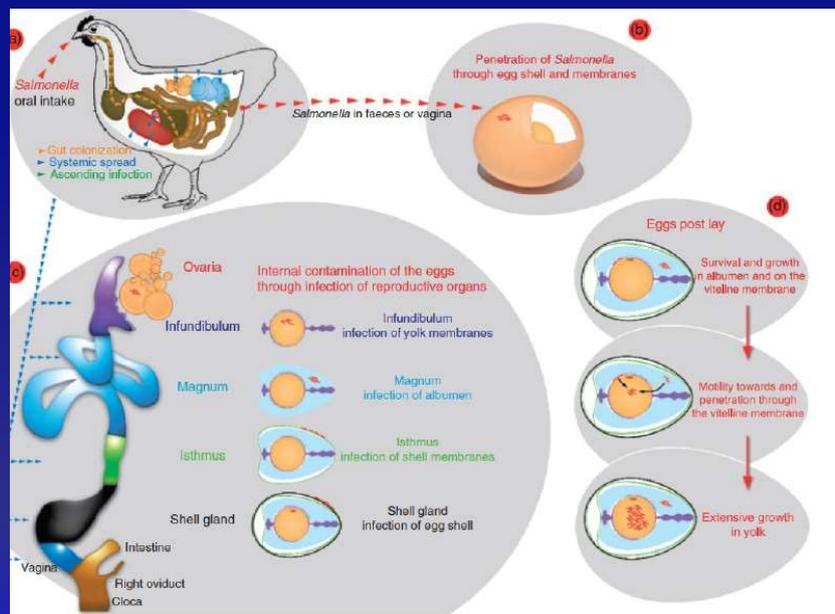
Devido ao fato de *Salmonella* Enteritidis ser altamente associada ao consumo de ovos crus ou mal cozidos, o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) recomenda:

- 1- Evitar ovos crus ou mal cozidos, especialmente para bebês, idosos e imunocomprometidos;
- 2- Ou utilizar ovos pasteurizados;
- 3- Ovos devem ser cozidos a no mínimo 63C - 15 segundos ou até a gema e a clara ficarem firmes. Eles devem ser comidos prontamente;
- 4- Pratos contendo ovos devem ser cozidos a 71C e;
- 5- Ovos crus devem ser armazenados a temperaturas inferiores a 7.2C.

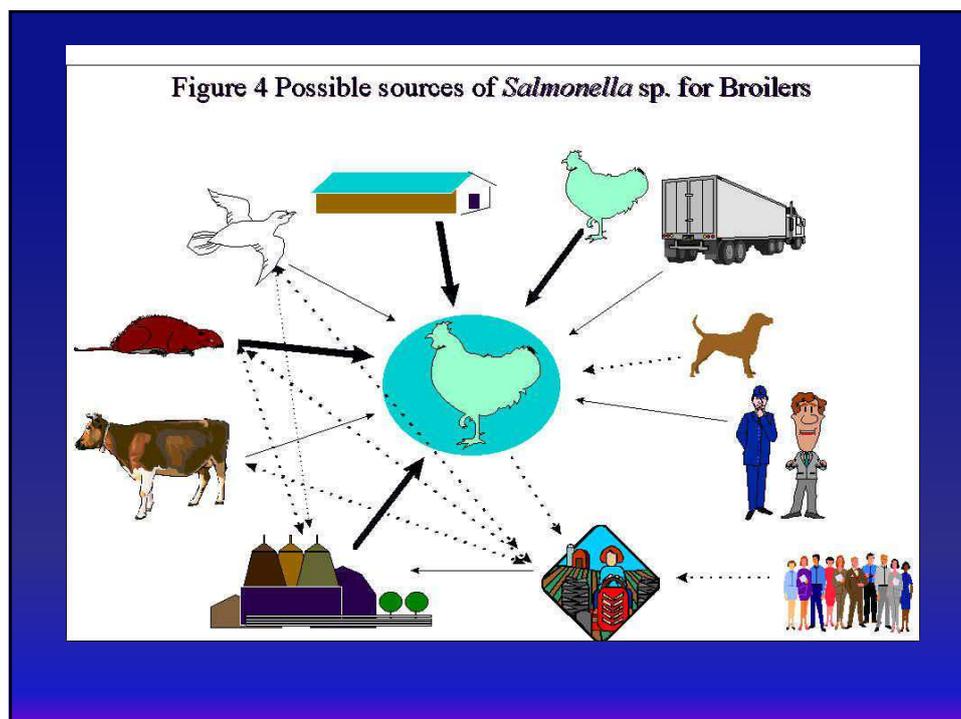
*Para cada 1 caso de *Salmonella* confirmado laboratorialmente, há cerca de 30 vezes mais casos que não foram confirmados.

Vias

1. Animais que abrigam a bactéria → contaminação de carnes, aves, ovos e leite (ciclo, homem – alimentação animal – produtos derivados de animais – homem)
2. *Salmonella* introduzida no ambiente por fezes, esterco, lixo e que pode vir a contaminar frutas e vegetais na fazenda
3. Contaminação cruzada em casa, serviços de alimentação, indústria
4. Portadores assintomáticos (Mary Typhoid)



<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x/pdf>



Como reduzir o problema?

1. Análise rotineira das aves – obtenção apenas de fornecedores livres de *Salmonella* e *Campylobacter*
2. Análise da ração - obtenção apenas de fornecedores livres de *Salmonella* e *Campylobacter*
3. Exclusão competitiva: Inocular os filhotes com microbiota de outros frangos livres de *Salmonella* e *Campylobacter*. Água ou spray nas incubadoras para que os filhotes sejam expostos aos micro-organismos corretos.
4. Probióticos
5. Bacteriófagos como agentes de biocontrole

Table 11.9 Examples of foodborne outbreaks of illness caused by *Salmonella* and possible reasons for their occurrence

Outbreak	Organism	Product(s)	Possible reasons for occurrence
1973/74, USA/Canada	<i>S. Eastbourne</i>	Chocolate balls and other chocolate novelty confectionery	<ul style="list-style-type: none"> Raw cocoa beans contaminated with <i>Salmonella</i> and subsequent inadequate heat processing Inadequate segregation of roasted beans from raw beans Heat processing of subsequent chocolate liquor not adequate to destroy <i>Salmonella</i> due to the low water activity of the liquor Consumption by vulnerable groups
1985, England	<i>S. Ealing</i>	Spray dried milk powder used for infant formula	<ul style="list-style-type: none"> Contaminated water used to test wet-down integrity of spray drier Water and bacterial contaminant leakage into the insulation cavity of the spray drier and milk powder contamination of the insulation cavity via a hole in the inner skin Contaminants proliferate in the insulation cavity and are re-introduced into the spray drier Consumption of the product by vulnerable groups
1994, USA	<i>S. Enteritidis</i>	Commercially produced ice cream	<ul style="list-style-type: none"> Pasteurised ice cream premix transported in a trailer previously used for raw egg Transport trailer inadequately cleaned/sanitised between loads Raw material used in a product not subjected to a further pathogen destruction stage

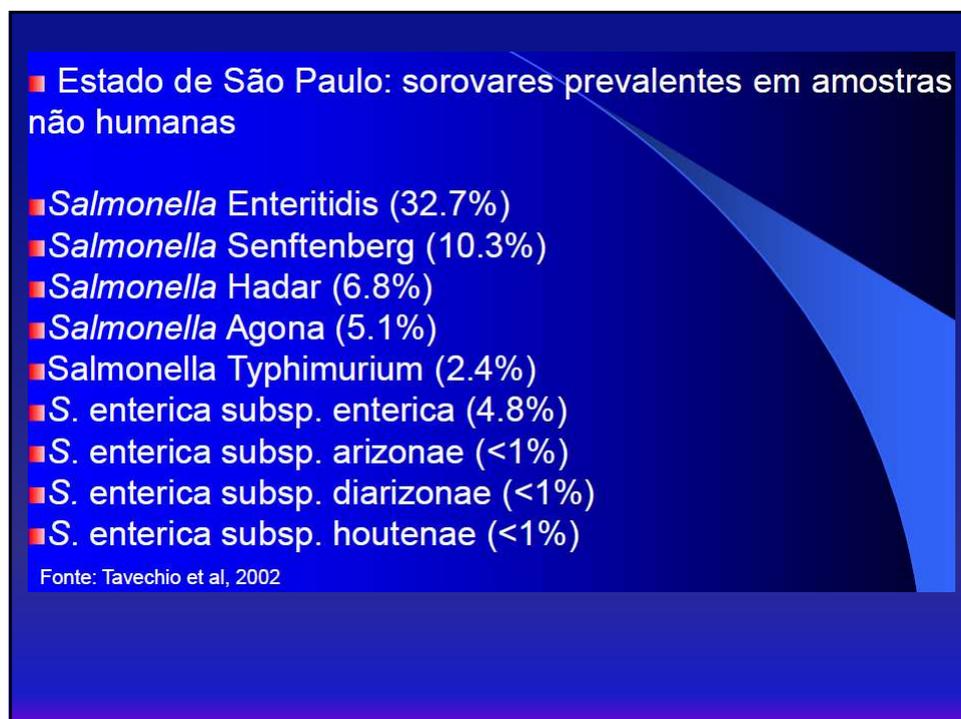
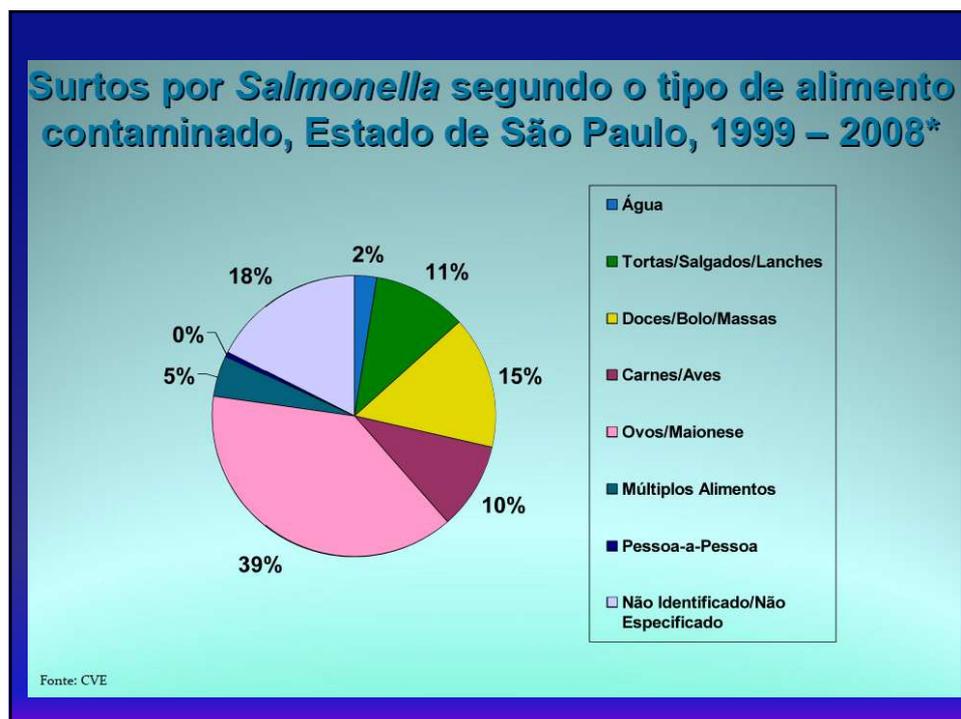
Source: adapted from Bell and Kyriakides (2002).

Roast – torrar

Table 1. Laboratory-confirmed human *Salmonella* infections reported to CDC, with the 20 most frequently reported serotypes listed individually, United States, 2011

Rank	Serotype	Number Reported	Percent
1	Enteritidis	7553	16.5
2	Typhimurium (including Typhimurium var. 5-)	6131	13.4
3	Newport	5211	11.4
4	Javiana	2937	6.4
5	14,[5],12:-	1339	2.9
6	Montevideo	1196	2.6
7	Heidelberg	1103	2.4
8	Muenchen	984	2.1
9	Infantis	910	2.0
10	Branderup	739	1.6
11	Oranienburg	721	1.6
12	Saintpaul	709	1.5
13	Mississippi	549	1.5
14	Thompson	536	1.2
15	Agona	505	1.1
16	Paratyphi B var. L(+) tartrate+	431	0.9
17	Bareilly	429	0.9
18	Typhi	383	0.8
19	Berta	321	0.7
20	Anatum	282	0.6
	Sub Total	32969	71.9
	All Other Serotyped	6864	15.0
	Unknown	4173	9.1
	Partially serotyped	1603	3.5
	Rough, mucoid, and/or nonmotile isolates	219	0.5
	Sub Total	12859	28.1
	Total	45828	100

All serotyped isolates are listed in Table 3



Estado de São Paulo: sorovares mais comuns em amostras humanas

Annual number of *Salmonella* isolates from humans: 15 most frequent serovars, 1996-2003

Serovar	Year								TOTAL (%)
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	
Enteritidis	352	262	268	331	309	316	262	296	2396 (67.4)
Typhimurium	17	3	35	24	22	19	37	28	185 (5.2)
4,5,12:i:-	55	5	31	25	7	19	26	16	184 (5.1)
Typhi	31	12	20	27	12	17	14	7	140 (4.0)
Dublin	7	8	19	5	9	11	13	14	86 (2.5)
Infantis	17	5	11	1	2	15	26	2	79 (2.3)
Agona	13	2	4	9	6	5	3	4	46 (1.4)
Panama	3	1	1	7	4	3	6	9	34 (1.0)
Oranienburg	4	4	5	3	2	2	7	4	31 (0.8)
Saintpaul	-	-	1	-	1	6	17	5	30 (0.8)
Newport	8	-	2	3	2	6	2	3	26 (0.7)
Hadar	7	3	2	-	3	-	1	6	22 (0.6)
Javiana	5	1	3	2	2	5	-	3	21 (0.5)
Mbandaka	1	-	1	1	-	2	7	2	14 (0.3)
Shwarzengrund	2	-	5	2	-	1	2	1	13 (0.4)
Other (53 Serovars)	37	21	33	26	29	31	29	41	247 (7.0)
Total	559	327	441	466	410	458	452	441	3554 (100.0)

Fonte: Fernandes et al, 2006

Brasil: grande variação na prevalência de *Salmonella* em produtos cárneos:



7 a 50% (RISTORI et al, 2007; TIROLLI e COSTA, 2006; CARVALHO e CORTEZ, 2005; VESSONI, 2004; SANTOS et al., 2000; FUZIHARA et al., 2000).



10,48 a 30% (BAU et al., 2001; CARVALHO e CORTEZ, 2005).



16% (CARVALHO e CORTEZ, 2005)



3,24% (LUIZ et al., 2004)



57,14% (AQUINO, 1991)

CMS

25% (CARVALHO e CORTEZ, 2005)

EUA ~15% de carne de frango
Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers



Prof. Dr. Bernadette D.G.M. Franco

Estratégias de controle

Dificuldades:

Ampla distribuição

Rastreabilidade

Resistência a antimicrobianos

Desconhecimento ou falta de cuidado por parte do consumidor

Estratégias de controle

1. Tratamento térmico
2. Irradiação
3. BPF – contaminação cruzada (lavagem de frango em casa)
4. Treinamento dos funcionários
5. Armazenamento em temperaturas adequadas (<5 ou > 55C)
6. Higienização e sanitização rigorosos (caso dos melões cantaloupes)
7. A indústria deve realizar análise de riscos dentro do plano APPCC;

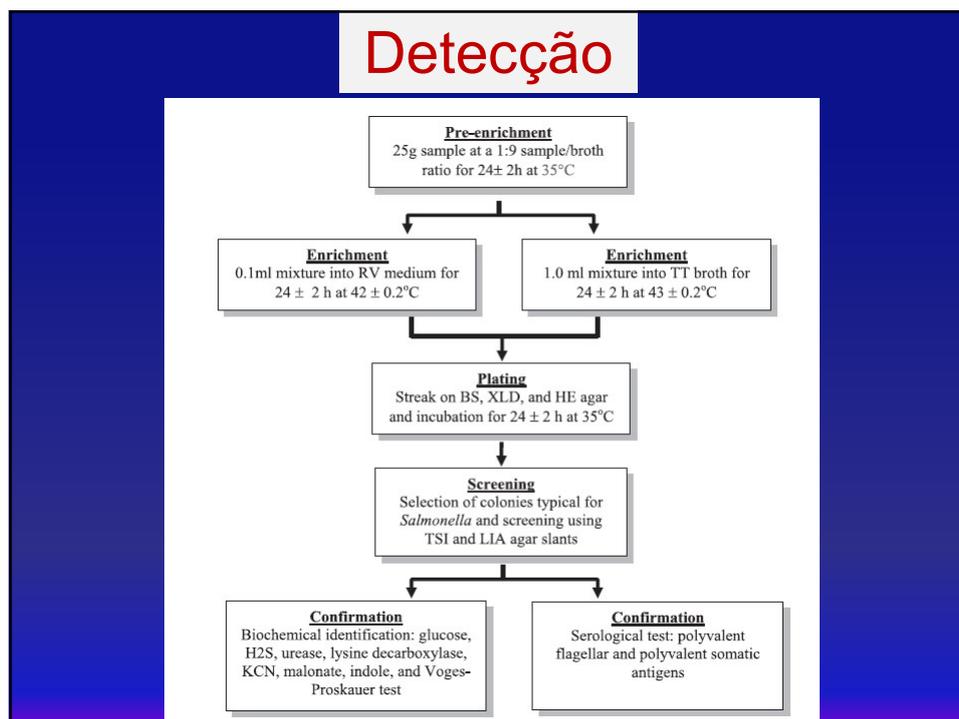
Problemas de higiene e contaminação pós-processamento

Se há uma etapa destinada a redução ou destruição do patógeno, é essencial que se evite contaminação do produto final!

- Layout apropriado da fábrica
- Divisão em áreas de baixo e alto risco com barreiras efetivas



Detecção



Alternativas rápidas

- Muitas opções:
- Melhoria nos métodos convencionais
- Métodos imunológicos,
- Moleculares (PCR),
- Biosensores,
- Bioquímicos

Bibliografia e mais

- Clive de W. Blackburn and Peter J. McClure. **Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and control**. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. 2002.
- James M. Jay et al. **Modern Food Microbiology**. Springer 2005.
- Franco, B. D. M.; Landgraf, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2007. 170p.
- Lee, K.-M. et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 47:264-276. 2014,
- Wong et al. *Salmonella* a foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 18:465-473, 2011.

Podcasts

- <http://www.radiolab.org/story/169879-patient-zero/>
- <http://www.microbeworld.org/podcasts/this-week-in-microbiology>