



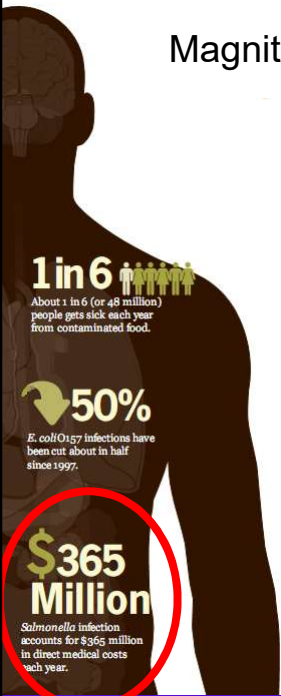
Universidade de São Paulo  
Brasil

## 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%)

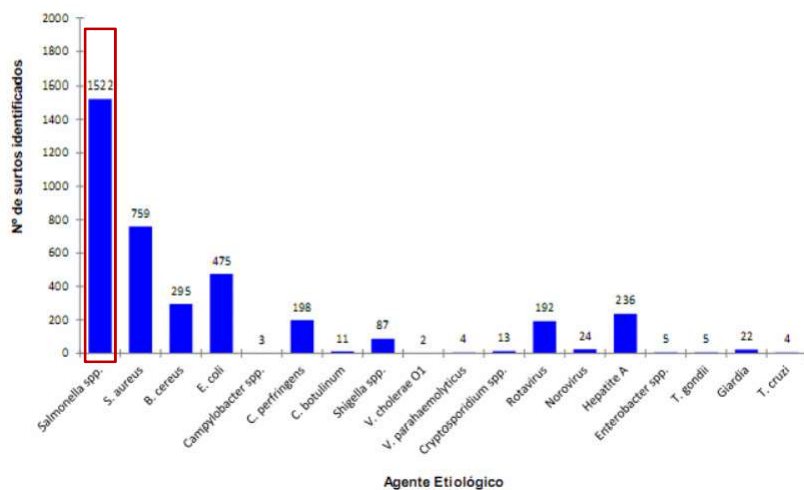
Das 1351 mortes

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  $\mu\text{m}$ ), 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

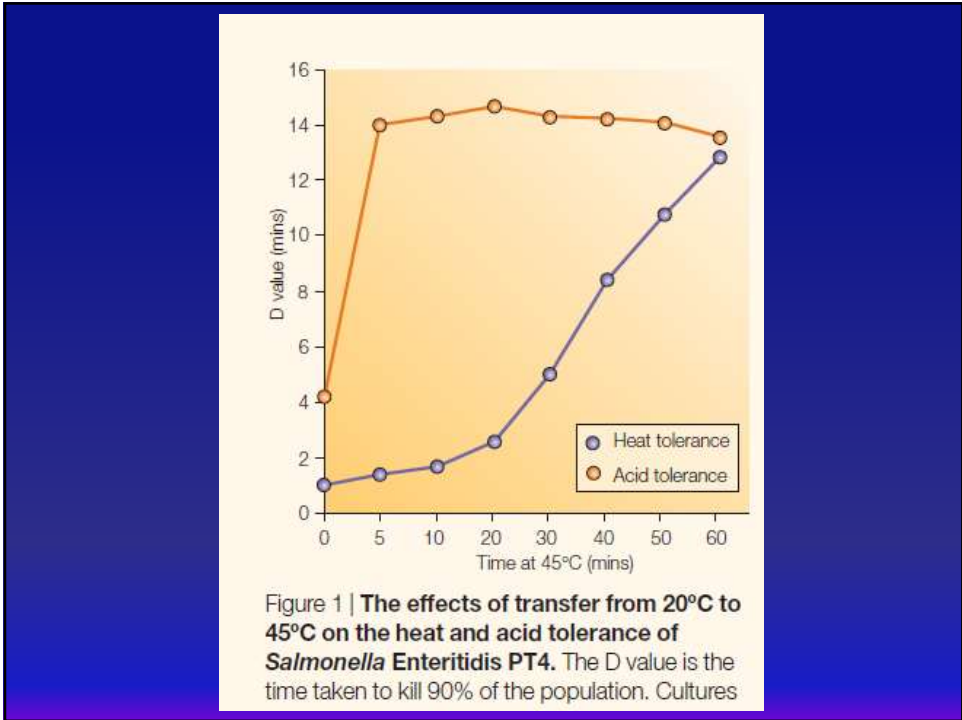
- ✓ 0,94 a >0,99
- não multiplica em Aw < 0,93

## 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](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*

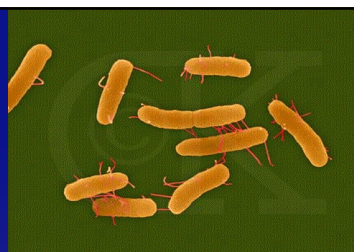
Duas espécies: *Salmonella enterica*

*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>	
Characters							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartarate <sup>(a)</sup>	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
$\gamma$ -glutamyltransferase	+	+	-	+	+	+	+
$\beta$ -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) = <i>d</i> -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. <i>Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)</i> , 1982, 133 B, 223-243 and 245-254. L. Le Minor, M.Y. Popoff, B. Laurent, D. Hermant. <i>Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.</i> , 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***

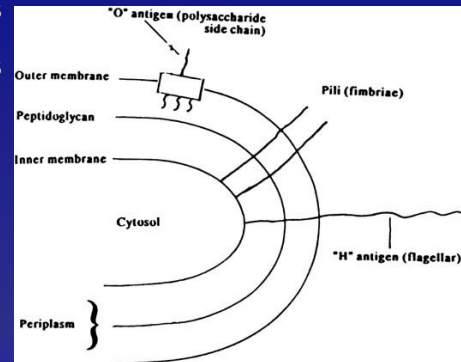
**Não é recomendado usar a abreviação *S. Typhimurium***

**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

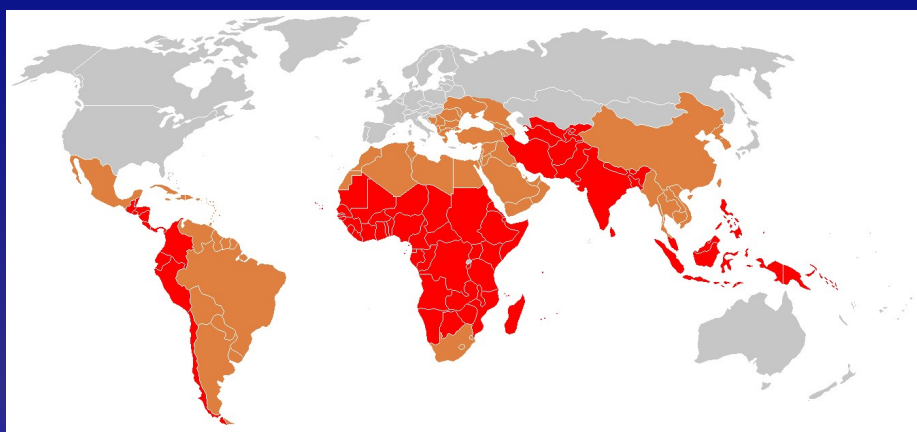
Mortalidade:

10-20%: casos não tratados

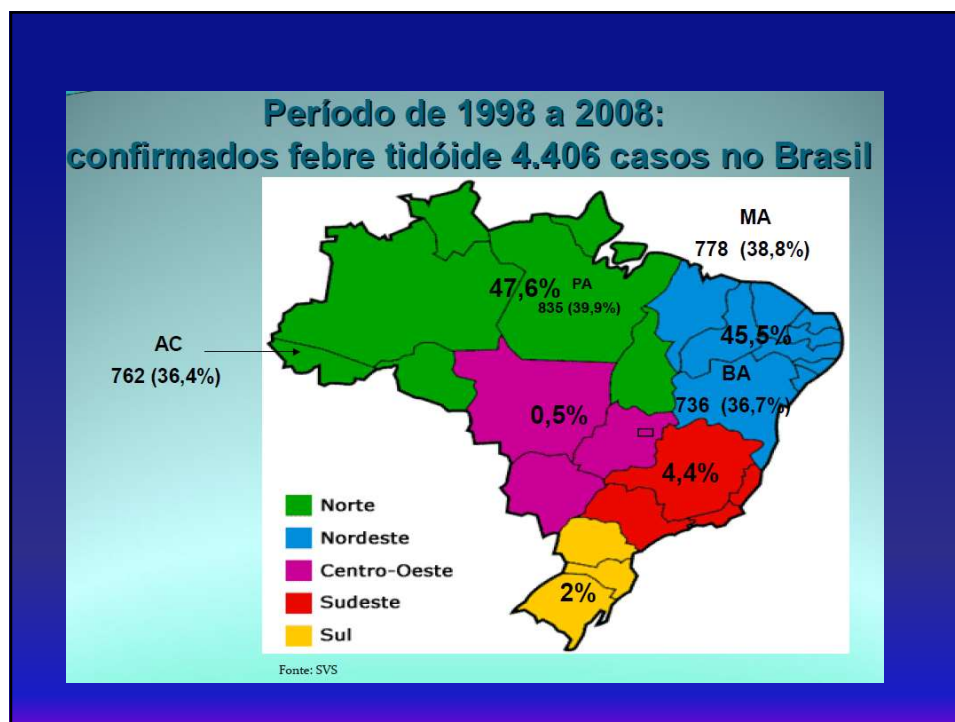
< 1%: tratamento com antibióticos (cloranfenicol, ampicilina ou trimetropin-sulfametoxazol)

- 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

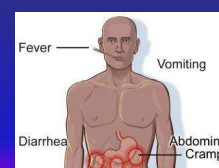


[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Fievre\\_typhoide.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Fievre_typhoide.png)



## 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: 10-10<sup>7</sup> 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:

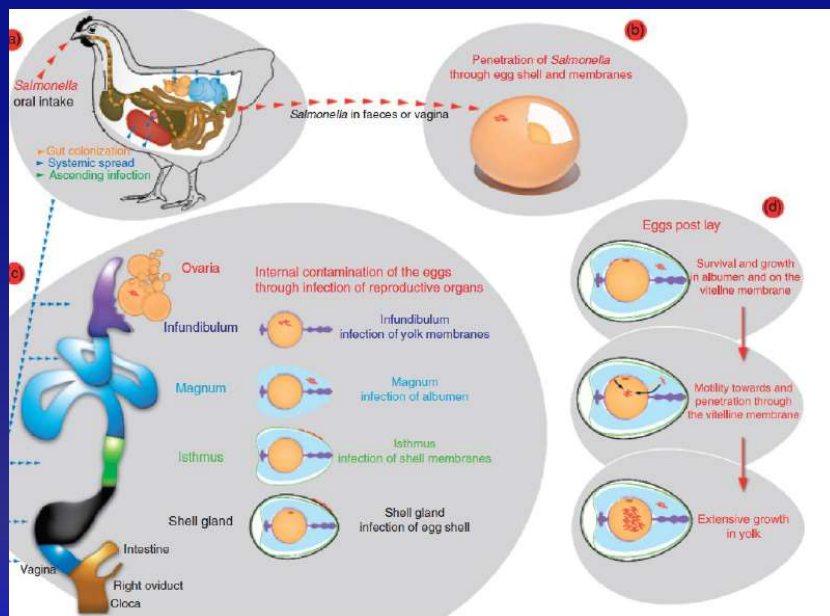
- 1- Evitar ovos crus ou mal cozidos, especialmente para bebês, idosos e imunocomprometidos;
- 2- Ou utilizar ovos pasteurizados;
- 3- Ovos devem ser cozidos a no mínimo 63C - 15 segundos ou até a gema e a clara ficarem firmes. Eles devem ser comidos prontamente;
- 4- Pratos contendo ovos devem ser cozidos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

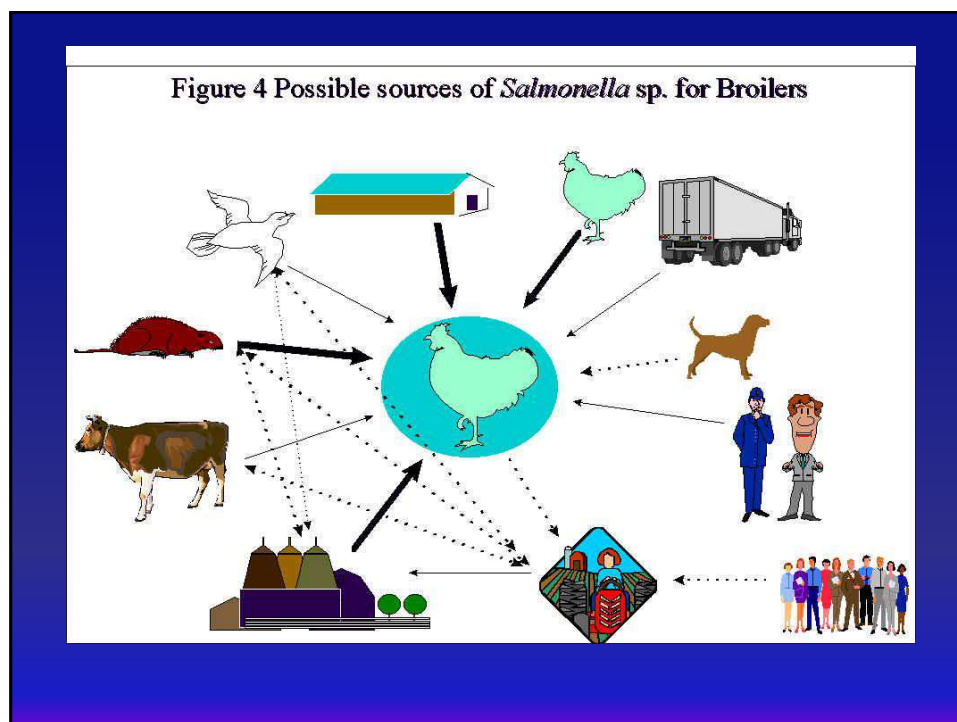


## Vias

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"> <li>Raw cocoa beans contaminated with <i>Salmonella</i> and subsequent inadequate heat processing</li> <li>Inadequate segregation of roasted beans from raw beans</li> <li>Heat processing of subsequent chocolate liquor not adequate to destroy <i>Salmonella</i> due to the low water activity of the liquor</li> <li>Consumption by vulnerable groups</li> </ul>
1985, England	<i>S. Ealing</i>	Spray dried milk powder used for infant formula	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contaminated water used to test wet-down integrity of spray drier</li> <li>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</li> <li>Contaminants proliferate in the insulation cavity and are re-introduced into the spray drier</li> <li>Consumption of the product by vulnerable groups</li> </ul>
1994, USA	<i>S. Enteritidis</i>	Commercially produced ice cream	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pasteurised ice cream premix transported in a trailer previously used for raw egg</li> <li>Transport trailer inadequately cleaned/sanitised between loads</li> <li>Raw material used in a product not subjected to a further pathogen destruction stage</li> </ul>

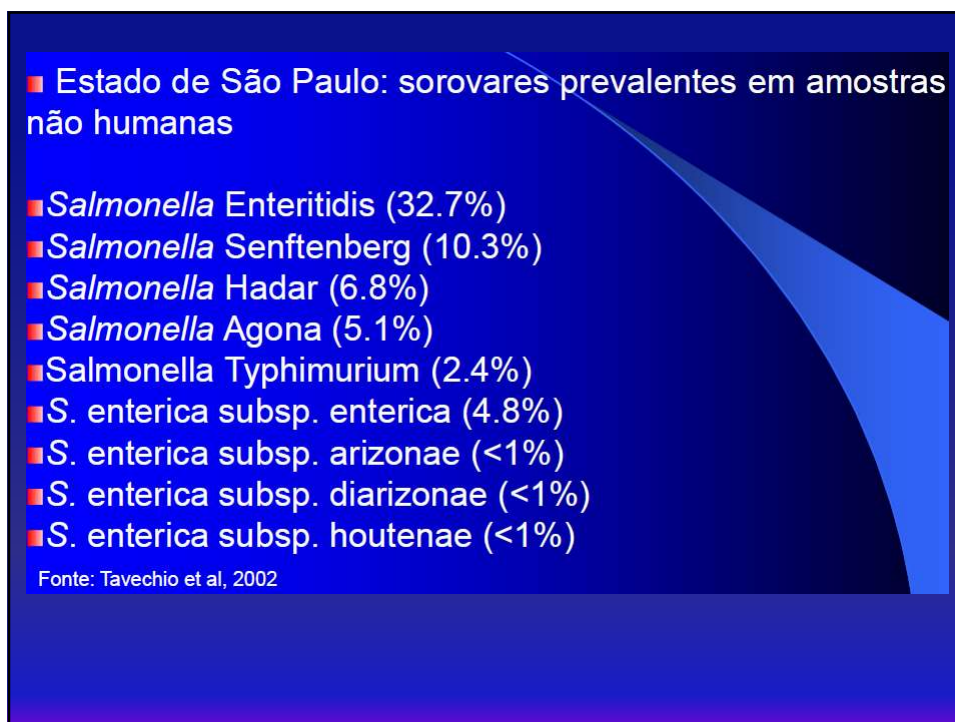
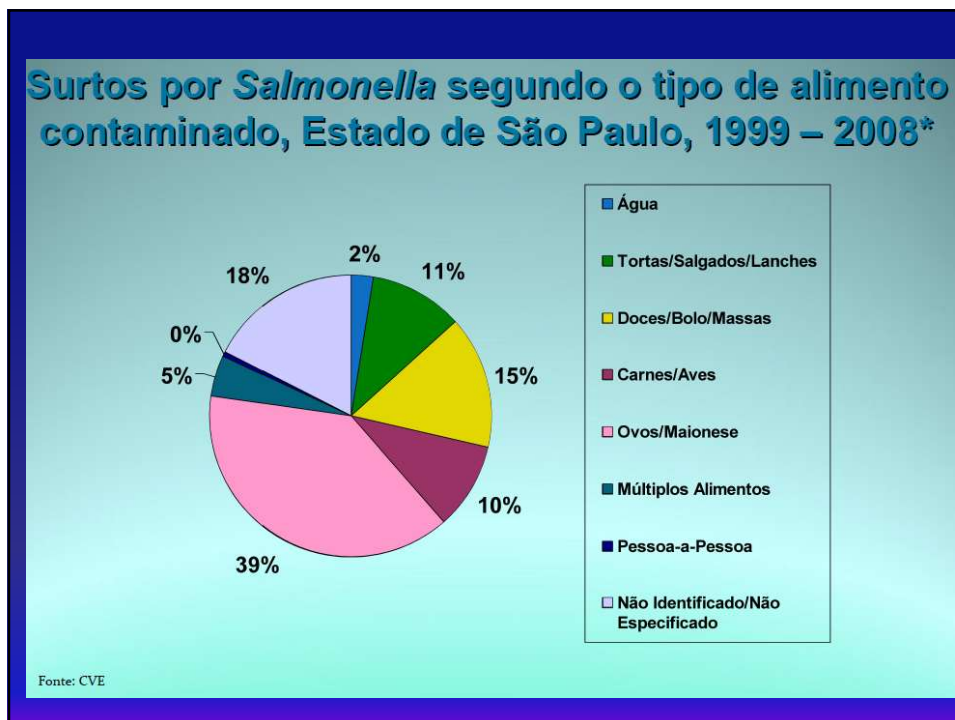
Source: adapted from Bell and Kyriakides (2002).

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
	<b>Sub Total</b>	<b>32969</b>	<b>71.9</b>
	All Other Serotyped	6864	15.0
	Unknown	4173	9.1
	Partially serotyped	1603	3.5
	Rough, mucoid, and/or nonmotile isolates	219	0.5
	<b>Sub Total</b>	<b>12859</b>	<b>28.1</b>
	<b>Total</b>	<b>45828</b>	<b>100</b>

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;

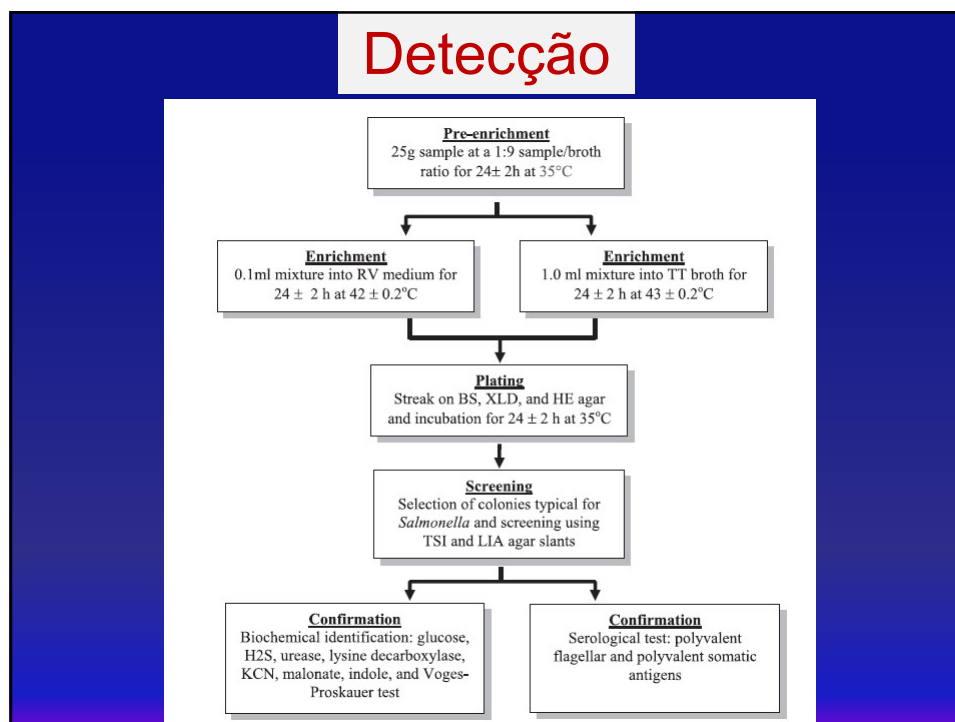
## Problemas de higiene e contaminação pós-processamento

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>