

A microscopic image showing several Clostridium bacteria. The bacteria are rod-shaped and some are in the process of forming spores, which appear as bright, oval structures within the cells. The background is a dark, textured surface.

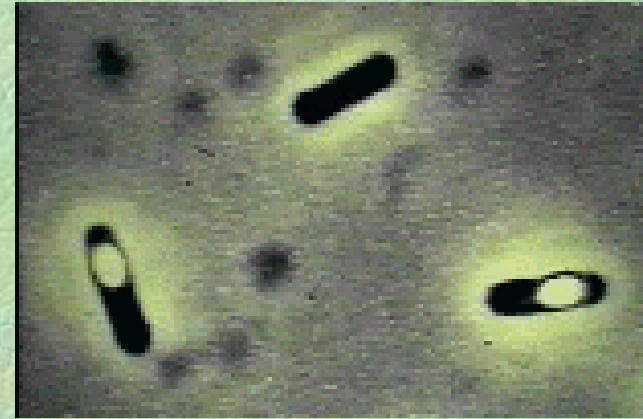
***Clostridium***

# Sistemática

➔ Ordem: *Bacillales*

- Gêneros

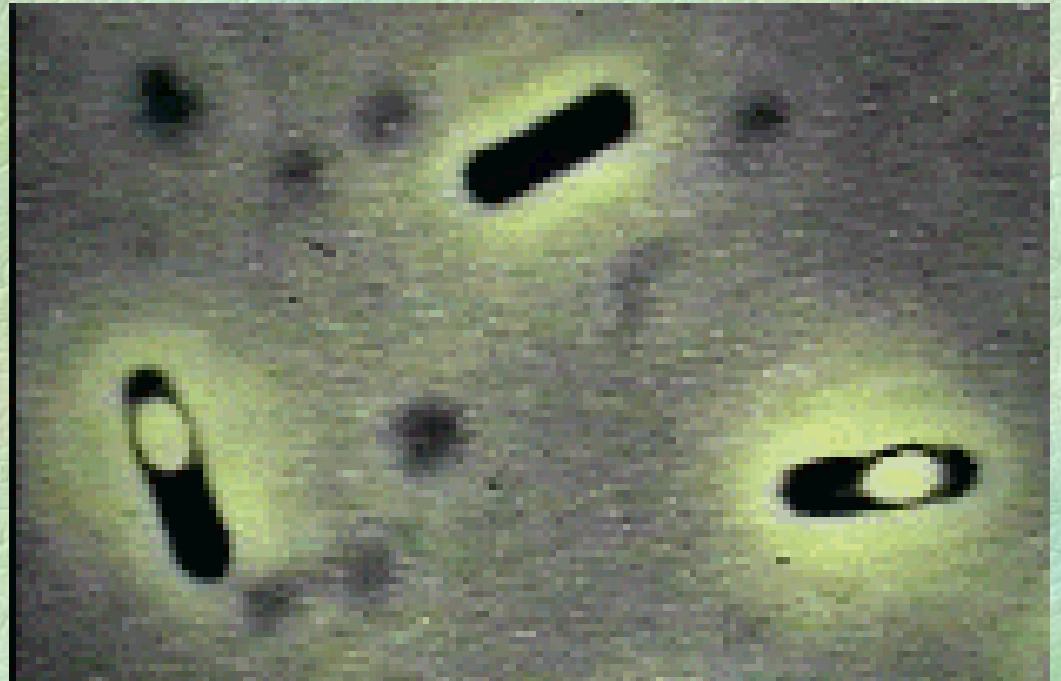
- *Clostridium*
- *Staphylococcus*
- *Streptococcus*
- *Listeria*
- *Lactobacillus*



**Perderam habilidade  
de esporular durante  
evolução?**

# Características

☞ Bastonetes esporulados



# Características

➔ Bastonetes esporulados

➔ Gram +

# Características

- ➔ Bastonetes esporulados
- ➔ Gram +
- ➔ Anaeróbios estrictos

# Características

- ➔ Bastonetes esporulados
- ➔ Gram +
- ➔ Anaeróbios estritos
- ➔ Principais fontes
  - trato intestinal de humanos
  - trato intestinal de animais

☞ *Clostridium*: mais de 150 sp

- Patogênicas
  - *C. difficile*
  - *C. perfringens*
  - *C. sordelli*
- *C. tetani*
  - Neurotoxina
    - » Paralisia tetânica

☞ *Clostridium*: mais de 150 sp

- Patogênicas
  - *C. difficile*
  - *C. perfringens*
  - *C. sordelli*
- *C. tetani*
  - Neurotoxina
    - » Paralisia tetânica

## **Envolvidas em doenças de origem alimentar**

- *C. botulinum*
- *C. perfringens*



☞ 2 espécies envolvidas em doenças de origem alimentar

- *C. botulinum*
- *C. perfringens*

☞ Outras espécies

- *C. baratii*\*
- *C. butyricum*\*
- *C. argentinense*\*

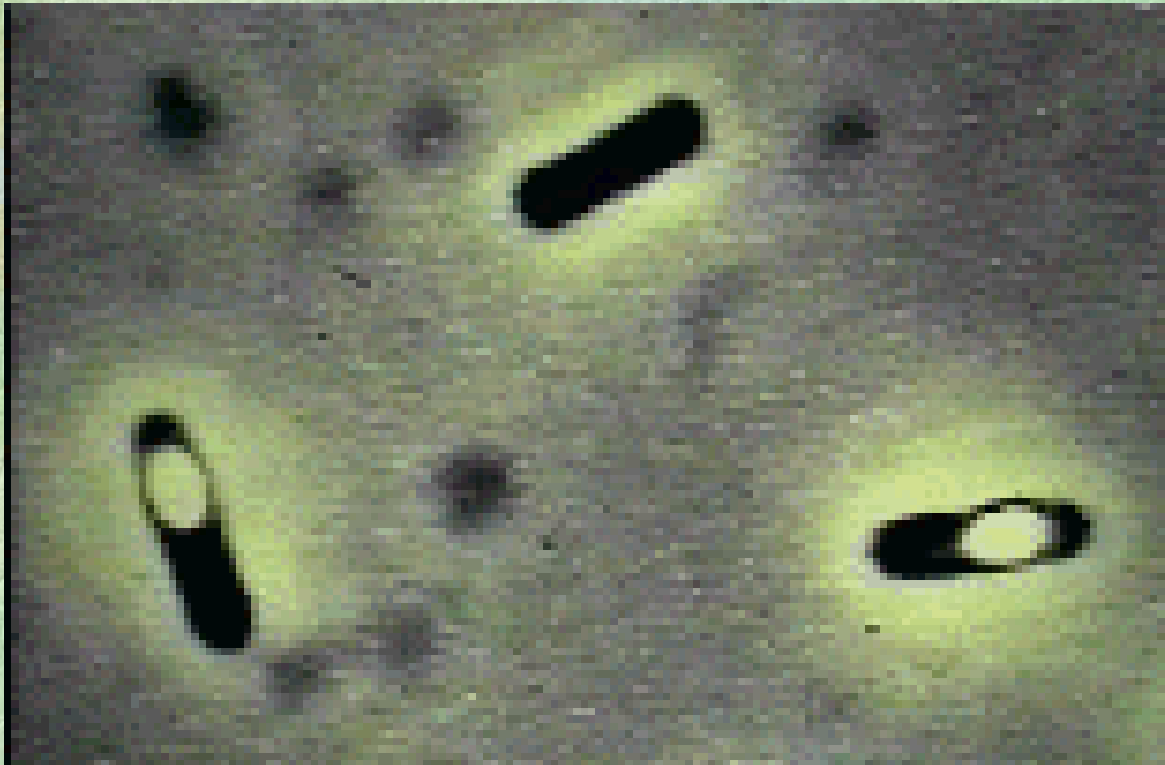
☞ 2 espécies envolvidas em doenças de origem alimentar

- *C. botulinum*
- *C. perfringens*

☞ Várias espécies causam deterioração em alimentos

- *C. butyricum*
- *C. thermosacharolyticum*
- etc

***C. botulinum***

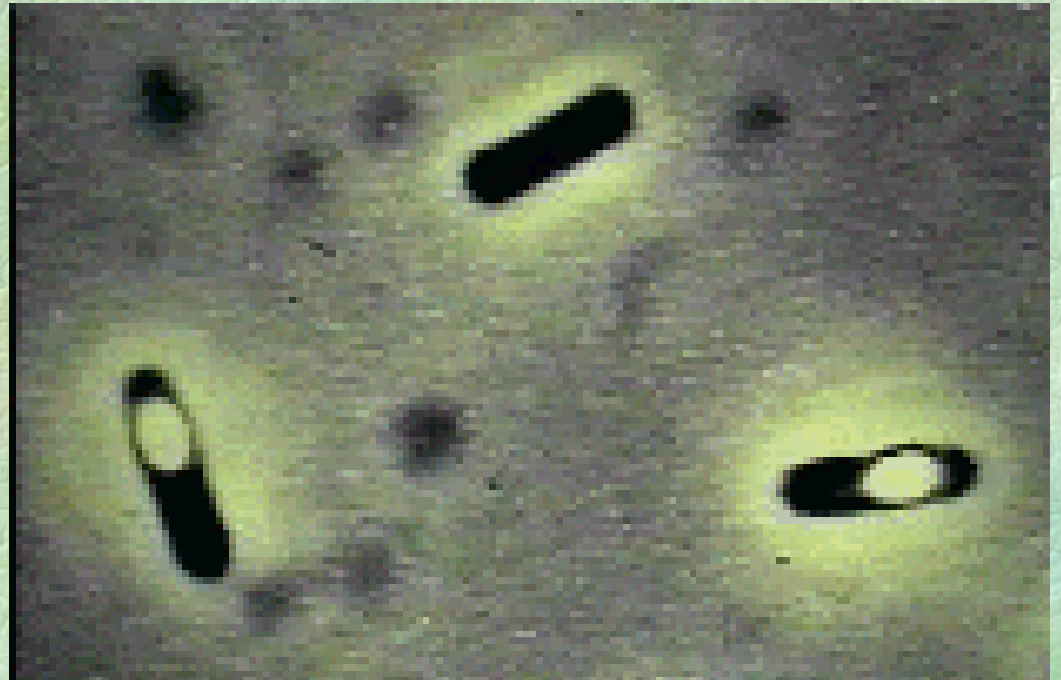


# Objetivos da aula *C. botulinum*

- ➡ Principais características e fontes dos esporos
- ➡ Alimentos que apresentam maior risco de contaminação
- ➡ Sintomas do botulismo
- ➡ Tipos de botulismo
- ➡ Características da toxina (termo-resistência, sítio de ação, tipos)
- ➡ Medidas preventivas e de controle em alimentos

## 👉 Esporo

- oval ou cilíndrico
- sub-terminal ou terminal



# Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

☞ Eh

- ótimo baixo
  - -350mv máximo desenvolvimento
  - +30 a +250 permite início da multiplicação

# Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

## ☞ Eh

- ótimo baixo
  - -350mv máximo desenvolvimento
  - +30 a +250 permite início da multiplicação

## ☞ Atmosfera envolvendo o alimento

- 20% O<sub>2</sub> ou 15 - 30% CO<sub>2</sub>
  - não interferem na produção de toxina
- 75% CO<sub>2</sub>
  - pode inibir produção de toxina

# Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

## ☞ Atmosfera envolvendo o alimento

- 20% O<sub>2</sub> ou 15 - 30% CO<sub>2</sub>
  - não interferem na produção de toxina
- 75% CO<sub>2</sub>
  - pode inibir produção de toxina

☞ **Obs.: embalagem a vácuo inibe multiplicação de deteriorantes, facilitando multiplicação de *C. botulinum***



# Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

## ☞ Conservantes

- Nitrito de sódio
  - efetivo
- Nitrato de sódio
  - inefetivo

# Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

## ☞ Conservantes

- Nitrito de sódio
  - efetivo
- Nitrato de sódio
  - Inefetivo
- Outros agentes efetivos
  - Sorbatos, parabenos
  - nisina
  - polifosfatos
  - metabissulfito

# Grupos e características de resistência e crescimento relevantes das toxinas botulinogênicas (Johnson, 2007)

Alimentos envasados

Importante alimentos refrigerados

Propriedades	<i>C. botulinum</i>			IV	V	VI
	I proteolítico	II não-proteolítico	III	<i>C. argentinense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Tipos de neurotoxinas	A,B,F	B,E,F	C, D	G	E	F
Temp. crescim. (°C)						
Minima	10	3	15	12	10	20
Ótima	35-40	18-25	35-40	30-37	30-37	30-40
Máxima	48	45	NA	45	~40	NA
pH mínimo	4,6	5,0	NA	NA	~3,6	NA
a <sub>w</sub> inibitória	0,94	0,97	NA	NA	?	NA
[NaCl] inibit. %	10	5	3	>3	NA	5
D <sub>100°C</sub> esporos (min)	~ 2,5	<0,1	NA	NA	NA	NA
D <sub>121°C</sub> esporos (min)	0,21	<0,005				

# Fontes e reservatórios

☞ Solo

☞ presente em todo o mundo

- Tipo A
  - Oeste EUA; China; Brasil, Argentina
- Tipo B
  - Este EUA (proteolítica);
  - UK; Europa continental (não proteolítica)
- Tipo E
  - regiões frias e águas temperadas
- Tipos C e D
  - regiões mais quentes

# Botulismo

## ☞ Botulismo humano

- Botulismo de origem alimentar
- Botulismo infantil
- Botulismo de feridas
- Toxemia intestinal do adulto (colonização intestinal do adulto)
- Botulismo iatrogênico
- Botulismo por inalação

## ☞ Botulismo animal

# Botulismo humano

- ➔ Botulismo de origem alimentar ou clássico
- ➔ Botulismo infantil
- ➔ Botulismo de feridas
- ➔ Toxemia intestinal do adulto (colonização intestinal do adulto)
- ➔ Botulismo iatrogênico

# Botulismo humano

## ☞ Botulismo infantil

- crianças < 1 ano
- toxina produzida "*in vivo*"
  - Infecção-intoxicação
- forma mais comum de botulismo nos EUA

# Botulismo humano

## ☞ Botulismo de ferida

- aumento significativo de casos a partir de 1991
- produção de toxina *in vivo*
- associado ao uso de drogas intravenosas
- toxina entra direto na circulação geral



# Botulismo humano

## ☞ Toxemia intestinal do adulto

- tipo muito raro
- semelhante ao botulismo infantil
  - causa: desconhecida
  - pacientes com sérias anormalidades no TGI ou uso de antibióticos

# Botulismo humano

## ☞ Toxemia iatrogênico

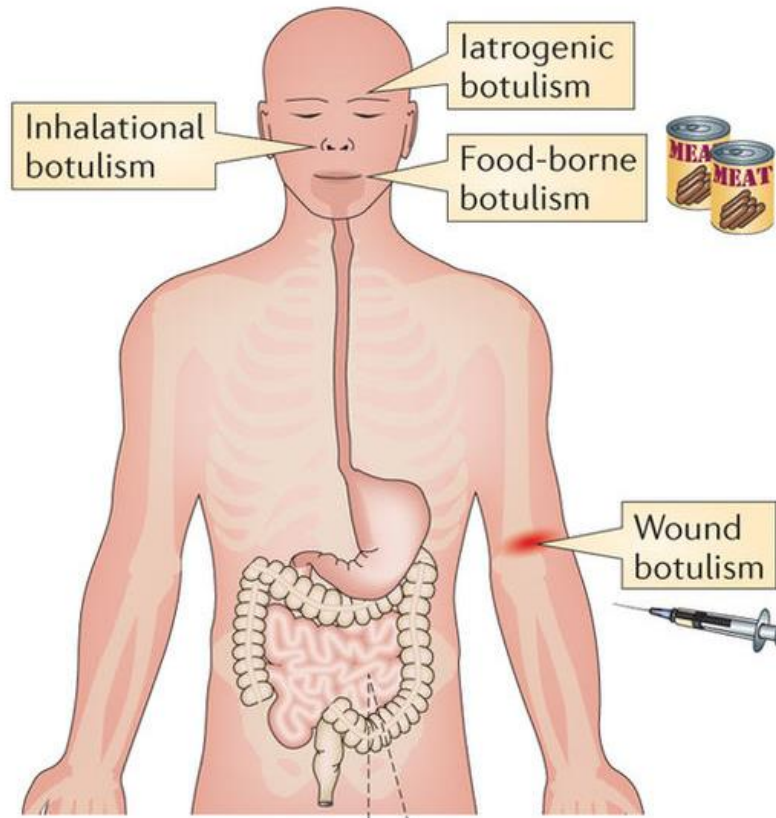
- tipo muito raro
- ocorre quando muita toxina botulínica é injetada seja por razões cosméticas ou médicas, como enxaquecas.

## ☞ Por inalação

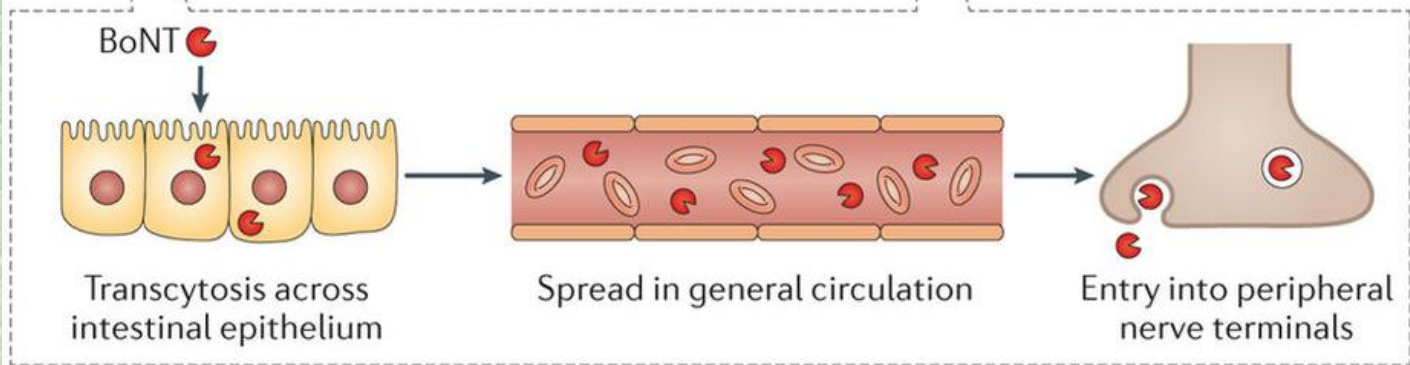
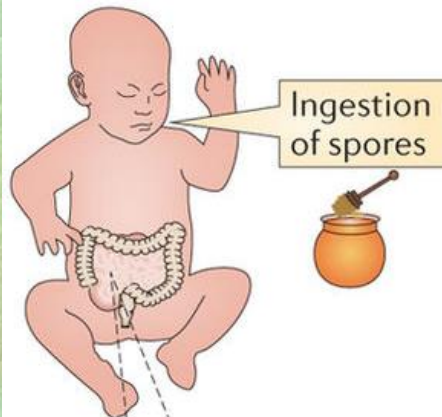
- Acidental ou intencional (Bioterrorismo)
  - Semelhante ao infantil

b

### Adult botulism



### Infant botulism



**Botulismo de origem alimentar**  
**CLÁSSICO**

## ☞ 7 tipos sorológicos

- A, B, E e F
  - causam doenças em humanos
  - F raramente associado
- C e D
  - causam doenças em animais
  - tipo D
    - envenenamento de bovinos por forragem contaminada

# Botulismo

➡ Grupos I e II

# Grupos e características de resistência e crescimento relevantes das toxinas botulinogênicas (Johnson, 2007)

Alimentos envasados

Importante alimentos refrigerados

Propriedades	<i>C. botulinum</i>			IV	V	VI
	I proteolítico	II não-proteolítico	III	<i>C. argentinense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Tipos de neurotoxinas	A,B,F	B,E,F	C, D	G	E	F

Clostridial species	Proteolytic <i>C. botulinum</i> group I	Non-proteolytic <i>C. botulinum</i> group II	<i>C. botulinum</i> group III	<i>C. argentinense</i> (group IV)	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Type	A; B; F; (H)*	B; E; F	C; D	G	E	F
Subtype	A1; A2; A3; A4; A5; A6; A7; A8; A9; A10; B1; B2; B3; B5 (Ba); B6; B7; A(B); Ab; Af; Af84; Bf; F1; F2; F3; F4; F5	B4; E1; E2; E3; E6; E7; E8; E9; E10; E11; F6	C; D; CD; DC		E4; E5	F7

\*Serotype H has been proposed as a novel serotype, but this remains to be experimentally verified.

pH mínimo	4,6	5,0	NA	NA	~3,6	NA
$a_w$ inibitória	0,94	0,97	NA	NA	?	NA
[NaCl] inibit. %	10	5	3	>3	NA	5
$D_{100}^{\circ C}$ esporos (min)	~ 2,5	<0,1	NA	NA	NA	NA
$D_{121}^{\circ C}$ esporos (min)	0,21	<0,005				

# Botulismo

- ➔ Grupos I e II
- ➔ Período de incubação
  - 12-36h (2h a 6 dias)



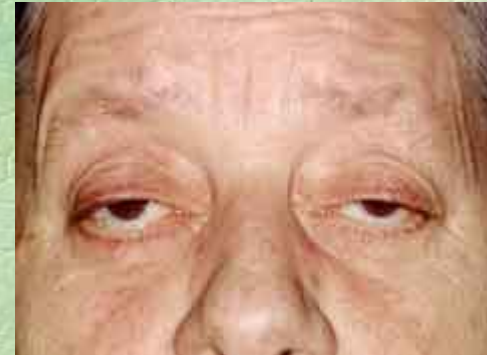
# Botulismo

## ☞ Período de incubação

- 12-36h (2h a 6 dias)

## ☞ Sintomas

- náuseas
- vômitos
- sintomas neurológicos:
  - enfraquecimento visual
    - ptose



# Botulismo

## ☞ Período de incubação

- 12-36h (2h a 6 dias)

## ☞ Sintomas

- náuseas
- vômitos
- sintomas neurológicos:
  - enfraquecimento visual
  - perda das funções normais da boca e garganta
  - fadiga, falta de coordenação motora
  - impedimento respiratório



doi:10.1128/9781555818463.ch17f1

# Botulismo

## ➡ Outros sintomas

- dores abdominais, diarreia
- constipação, retenção urinária

## ➡ SNC e Troncos nervosos

- não são diretamente afetados

## ➡ Músculos respondem a estímulos

## ➡ Funções cognitivas e sensoriais não afetadas

## ➡ **Fatalidade**

- antigamente 50%
- atualmente 5 - 15%

# Botulismo

☞ Pode ser confundida com:

- Síndrome de Guillain-Barré: dificuldade de deglutir, visão dupla, fraqueza muscular
- Miastenia gravis: doença neuromuscular: fraqueza e fadiga anormalmente rápida dos músculos voluntários. A fraqueza é causada por um defeito na transmissão dos impulsos dos nervos para os músculos. Ptose, dificuldade de deglutir
- Várias formas de envenenamento
  - CO<sub>2</sub>
  - Organofosforados
- Eletroneuromiografia permite a exclusão de outras síndromes

# Botulismo

## ☞ Tratamento

- Remoção do TGI da toxina não absorvida
- Neutralização da toxina com anti-toxin
  - CVE/Centro de referência de botulismo
    - Fone: 0800-0555 466
- Traqueostomia ou ventilação

# Botulismo

## ☞ Recuperação total

- Vários meses
- paralisia parcial
  - 8 meses

# Botulismo

## ☞ Agente causal

- Neurotoxina
- Natureza proteica
  - ∴ Antigênica
- Alta toxicidade

# Neurotoxina

➡ Alta toxicidade

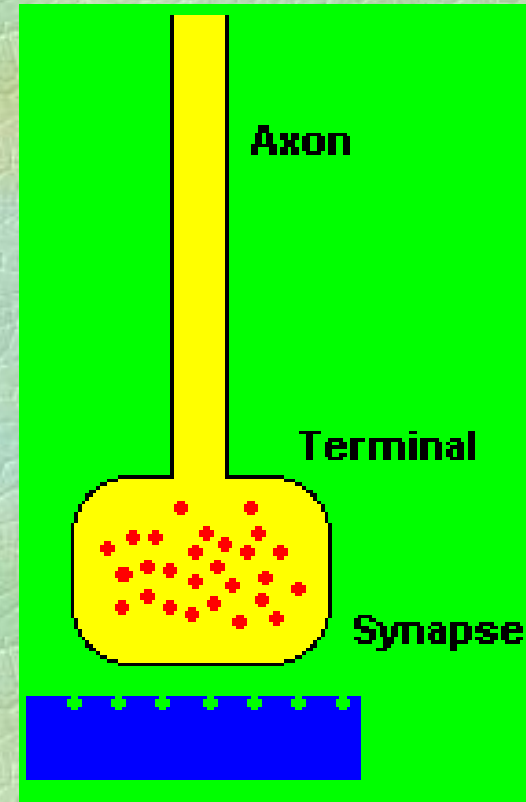
➡ Dose infectiva mínima

- para camundongos
  - 10pg
- não estabelecida em humanos
  - 1 ng/kg (?)
  - 30ng capaz de causar doença



# Neurotoxina

- ☞ atua nas junções mioneurais
- ☞ inibe liberação de acetilcolina



# Neurotoxina

☞ Todas as 7

- Estrutura
- Modo de ação
- Proteínas de 2 cadeias

} Similares

# Toxina botulínica

Termolábil: – inativada a 85°C/ 5'

PM 150kDa (1295aa) (pró-toxina)

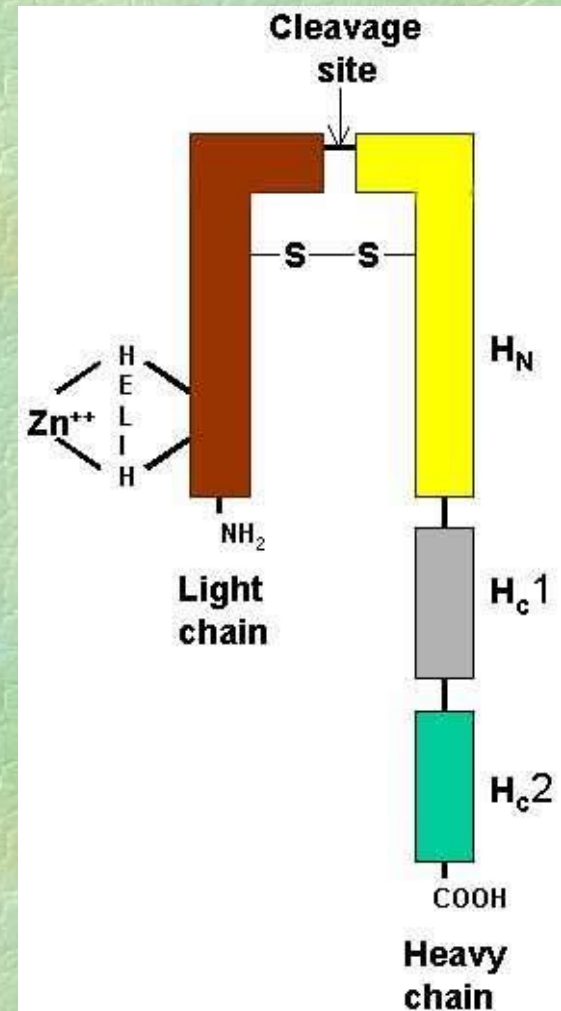
Cadeia leve (**L chain**) – 50kDa – 447 aa

Cadeia Pesada ( H chain )– 100kDa

Vários domínios: funções diferentes

Para ter ação: clivada

Grupo I: clivada enz. Proteolíticas de cél. veg.



# Toxina botulínica

Cadeia leve (**L chain**) – 50kDa – 447 aa

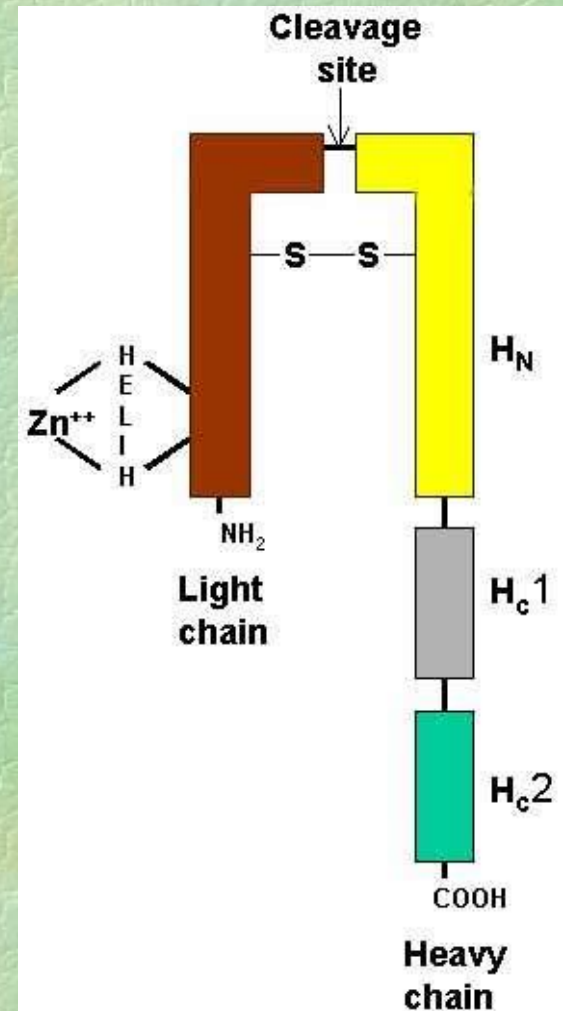
Cadeia Pesada ( H chain )– 100kDa

Vários domínios: funções diferentes

Para ter ação: clivada

Grupo I: clivada enz. proteolíticas de cél. veg.

Grupo II: clivada enz. proteolíticas produzidas pelo intestino humano



# Toxina botulínica

Termolábil:

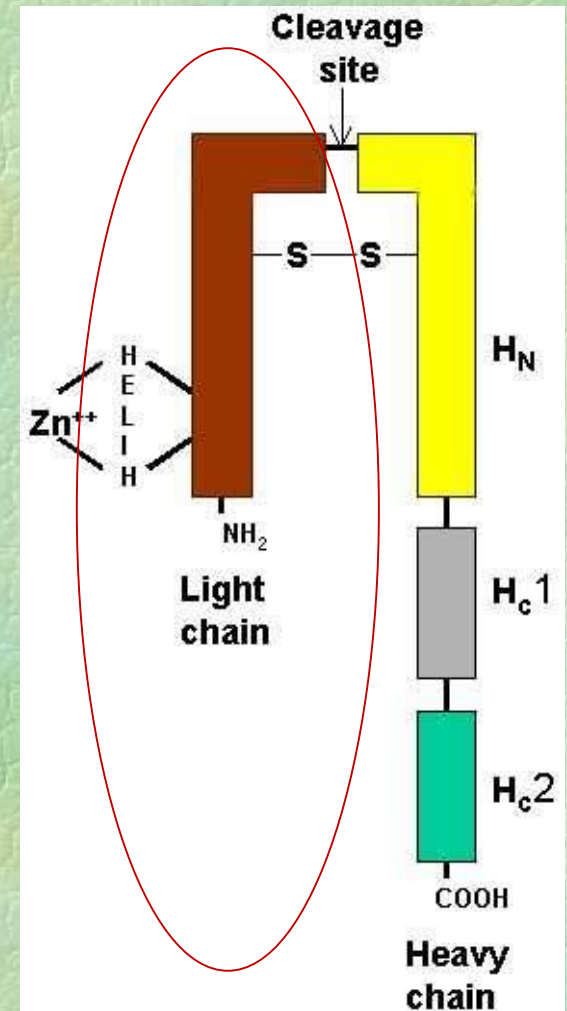
Cadeia leve (L chain) – 50kDa  
447aa

Atividade endopeptidásica no  
substrato neuronal

Sítio ativo: região com  $Zn^{++}$  e com  
pelo menos 16 aa residuais.

Atividade metaloproteásica  $Zn$  →  
dependente

liberação neurotransmissores →  
bloqueio vesículas de fusão pré-  
sinápticas.



# Toxina botulínica

Termolábil:

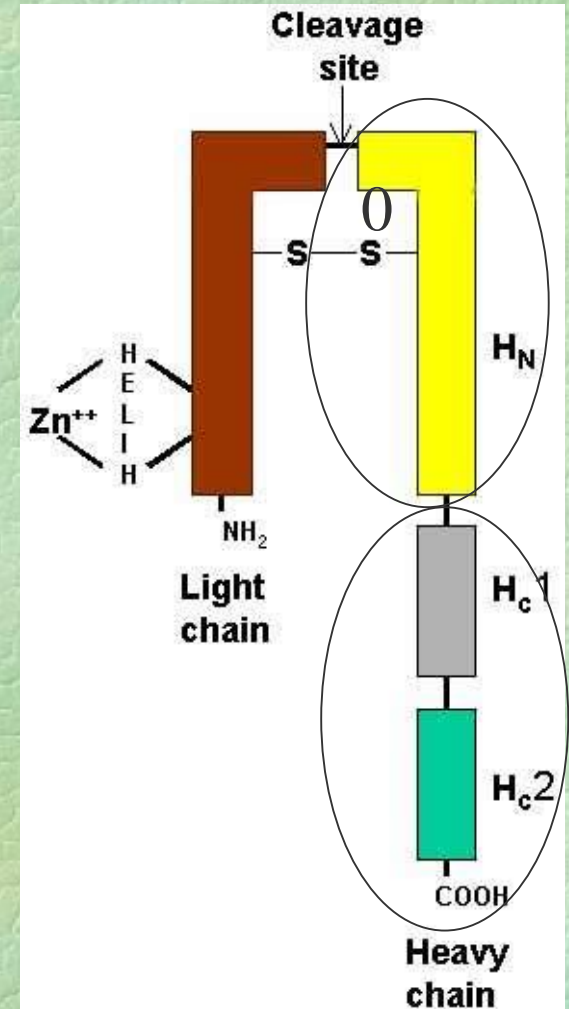
PM 150kDa (1295 aa)

Cadeia leve (L chain) – 50kDa  
(447aa)

Cadeia Pesada ( H chain )– 100kDa

$H_n + H_c = 100kDa$

Domínios com funções diferentes



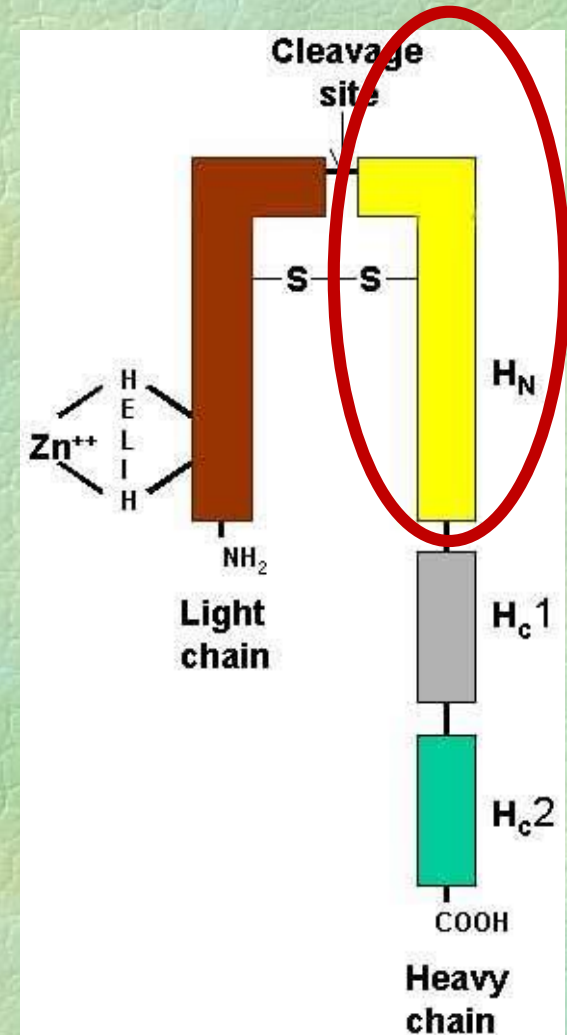
# Toxina botulínica

Cadeia Pesada (H chain)

H<sub>n</sub> + H<sub>c</sub> + 100kDa

Vários domínios: cada um com sua função

Domínio H<sub>N</sub>: (terminal N da cadeia H): necessário para a translocação da cadeia L através da membrana das vesículas endocíticas para o citoplasma neuronal



# Toxina botulínica

Cadeia Pesada (H chain )

Hn + Hc+ 100kDa

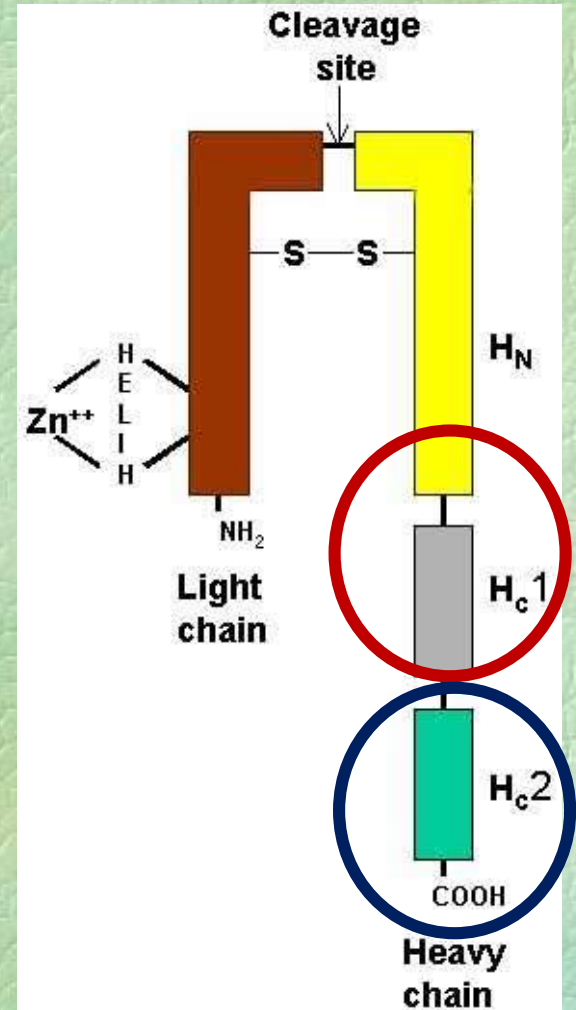
Vários domínios: funções diferentes

Domínio H<sub>C</sub>: (terminal C da cadeia H):

H<sub>C</sub>1: ligação acessório

H<sub>C</sub>2: ligação a gangliosídeos e a proteínas sinápticas

L + H ponte di-sulfeto



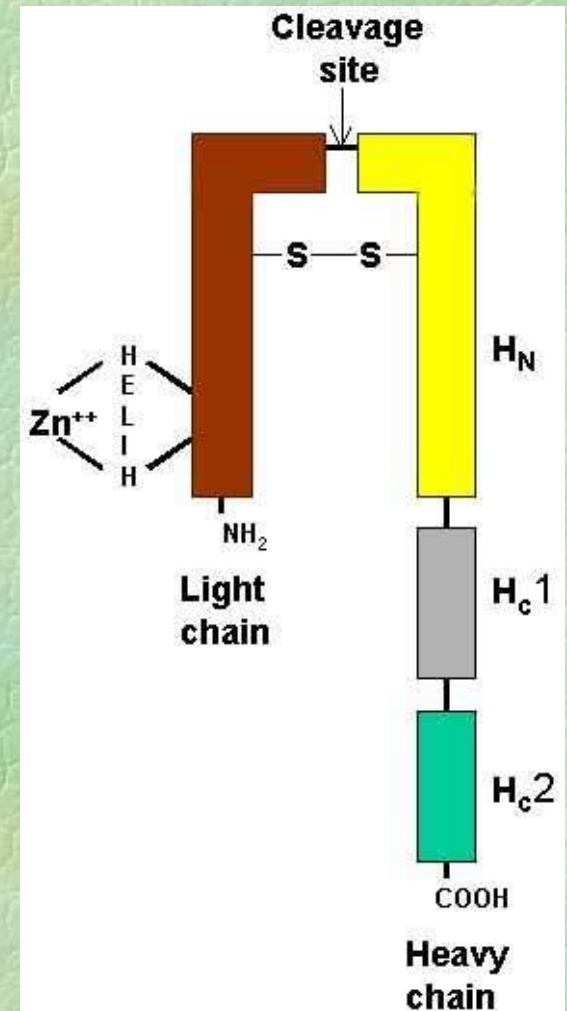


# Toxina botulínica

Modo de Ação:

Neurotoxina bloqueia a liberação de Acetilcolina nos terminais nervosos em junções neuromusculares  
Dano permanente, mas o organismo pode se recuperar fazendo novas terminações nervosas.

Demora de 1 a 12 meses para se recuperar porque precisa fazer novas terminações nervosas.



# Toxina botulínica

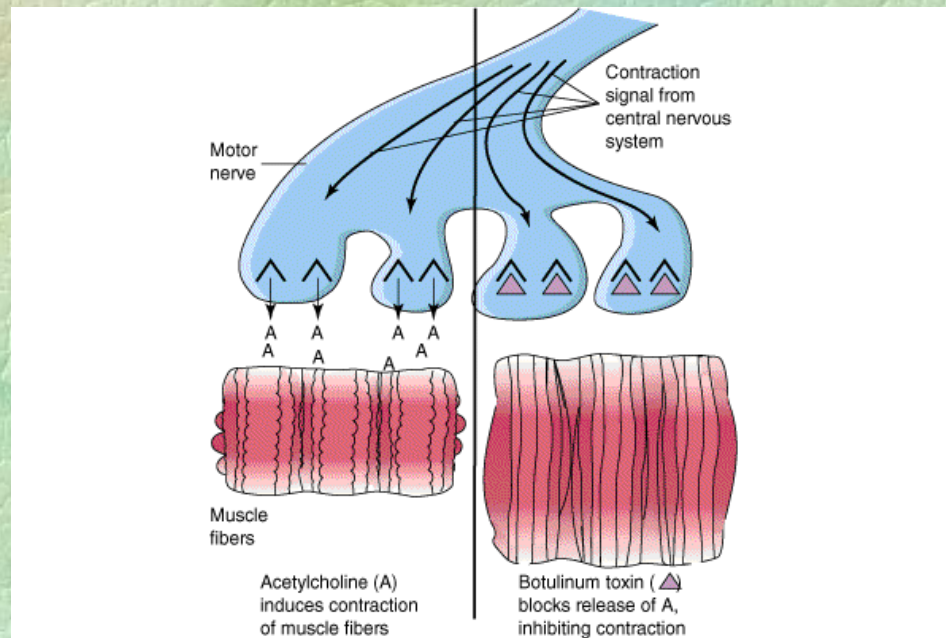
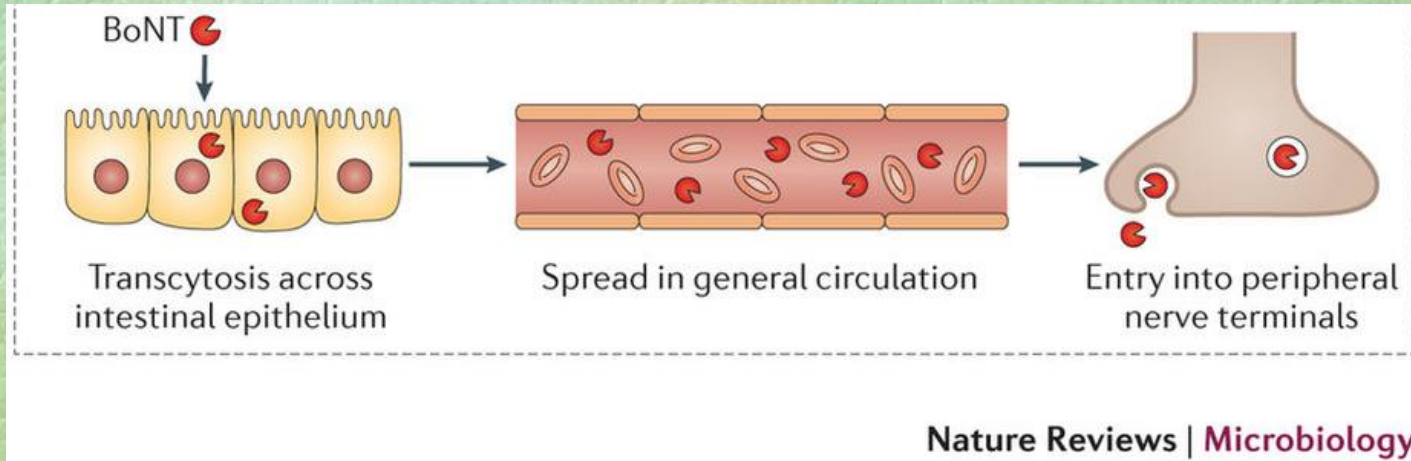
## 👉 Codificação da produção

- Varia com sorotipo
  - BoNTs A, B, E e F e prot não tóxicas associadas
    - Cromossomais
  - BoNTs C<sub>1</sub> e D e prot não tóxicas associadas
    - Bacteriófagos
  - BoNT G
    - Plasmidial

Clostridial species	Proteolytic <i>C. botulinum</i> group I	Non-proteolytic <i>C. botulinum</i> group II	<i>C. botulinum</i> group III	<i>C. argentinense</i> (group IV)	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Type	A; B; F; (H)*	B; E; F	C; D	G	E	F
Subtype	A1; A2; A3; A4; A5; A6; A7; A8; A9; A10; B1; B2; B3; B5 (Ba); B6; B7; A(B); Ab; Af; Af84; Bf; F1; F2; F3; F4; F5	B4; E1; E2; E3; E6; E7; E8; E9; E10; E11; F6	C; D; CD; DC		E4; E5	F7

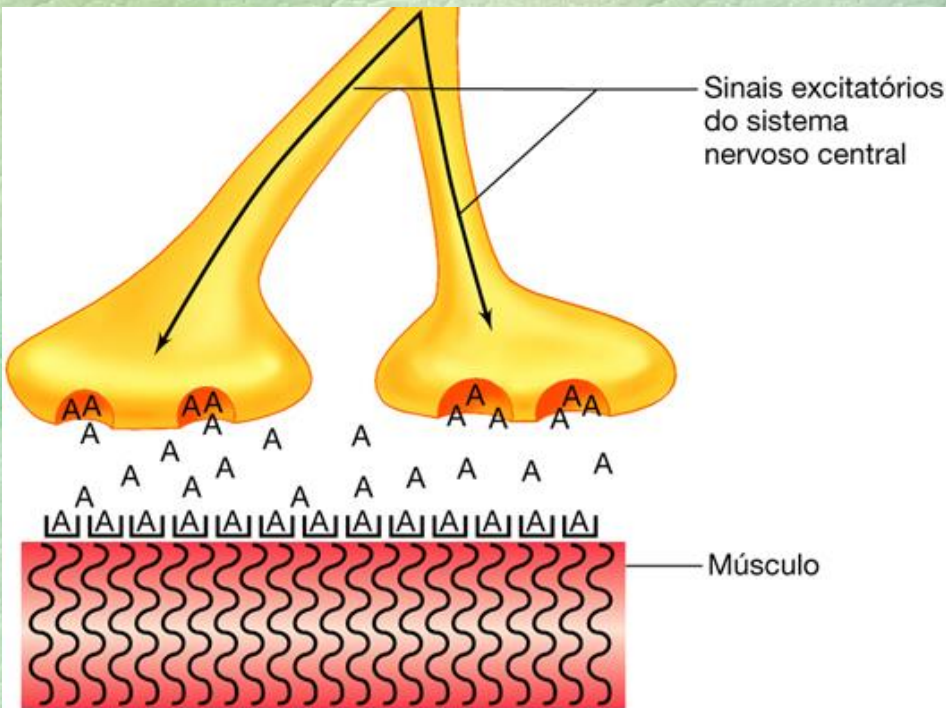
\*Serotype H has been proposed as a novel serotype, but this remains to be experimentally verified.

# 👉 Mecanismo de patogenicidade



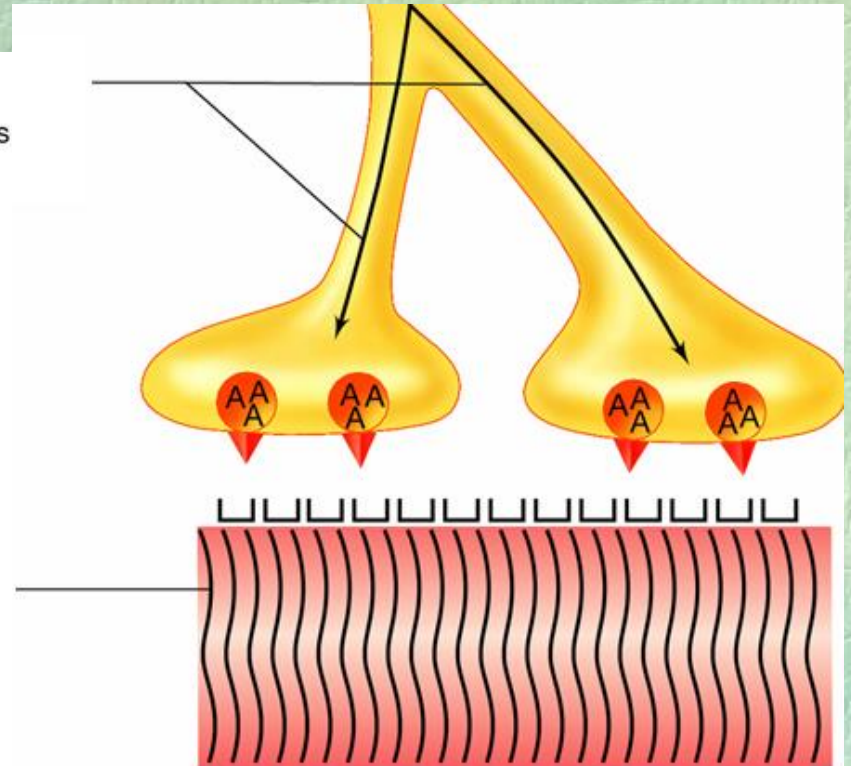
# Botulismo

**Sintomas:** a toxina liga-se às membranas pré-sinápticas nos neurônios motores na junção neuro-muscular, bloqueando a liberação de acetilcolina, impedindo a contração do músculo.



## Normal

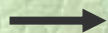
A acetilcolina (A) induz a contração das fibras musculares



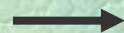
## Botulismo

A toxina botulínica ▲ bloqueia a liberação de A, inibindo a contração

**Neurotoxina  
Ingestão**



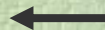
**TGI**



**Absorção ID**



**Bloqueio neuro-  
transmissores**



**Transporte nervos  
suscetíveis**

# Botulismo

## ☞ Alimentos usualmente envolvidos

- conservas caseiras  $\text{pH} > 4,5$ 
  - Vegetais
    - Milho
    - Beterraba
    - Aspargo
    - Cenoura
  - Carnes
  - Pescados

# Botulismo

## ☞ Alimentos usualmente envolvidos

- conservas caseiras  $\text{pH} > 4,5$ 
  - vegetais
  - carnes
  - pescados
- comercialmente processados
  - Restaurantes
    - Batatas assadas
    - Molho de queijo
    - Oleo de alho

# Botulismo

## ☞ Alimentos usualmente envolvidos

- comercialmente processados
  - Restaurantes
  - Alimentos procesados
    - com pH >4,6
      - » Suco de cenoura – (USA 2006)
      - » "Nachos to go" – Australia (2007)
    - com acidificação inadequada (2007)
      - » Baby food - USA
      - » Azeitonas italianas - recall



# Botulismo: alimentos “inesperados”

## ☞ Suco de cenoura comercial

- MMWR 55(40), 2006
- Georgia
  - Toxina tipo A
    - no soro
    - nas fezes
    - resto do suco
  - Garrafas fechadas mesmo lote (-)

# Botulismo

## ☞ Suco de cenoura comercial

- MMWR 55(40), 2006
- Georgia
- Florida
  - Toxina A
    - Soro
    - Resto do suco (mantido sem refrigeração)
    - Mesma marca, lote diferente da Georgia

# Botulismo

## ☞ Suco de cenoura comercial

- MMWR 55(40), 2006
- Georgia
- Florida
- Características do produto
  - pH  $\approx$  6,0
  - Baixo teor de açúcar
  - Refrigeração única forma de controle

# Botulismo na Alemanha

👉 Ingestão de feijões verdes em conserva caseira

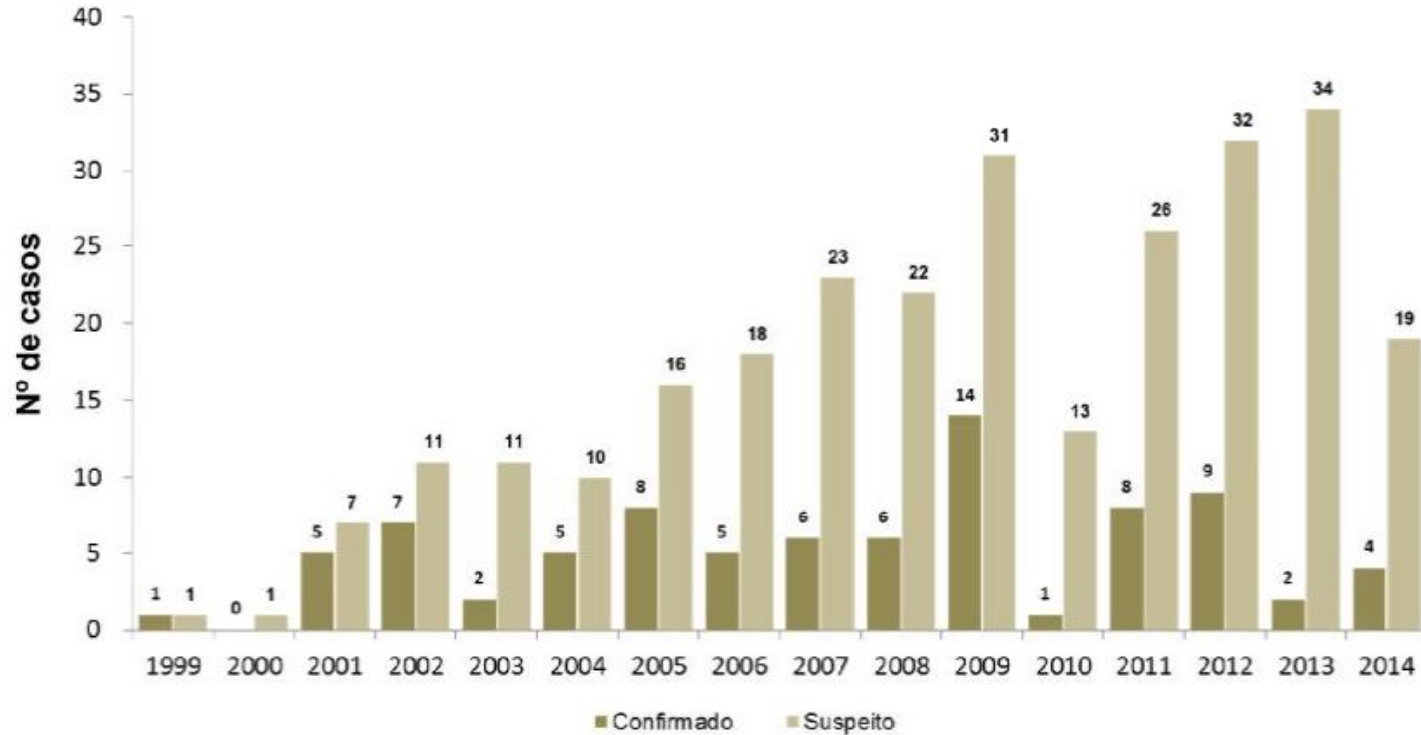
Table 1

Selected periods of Cases 1 and 2 in the disease course

	Ingestion of toxin to symptom onset, hours	Symptom onset to resp. failure, hours	Ingestion of toxin to resp. failure, hours	Duration of intubation, days
Patient 1 (female, age 47 years)	30	36	66	~165
Patient 2 (male, age 51 years)	48	82	130	~135

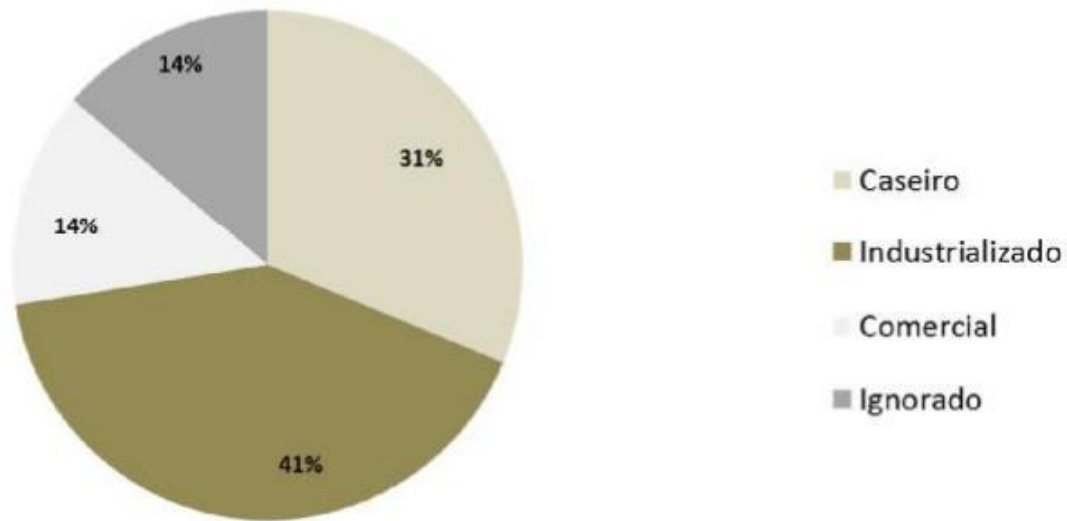
*resp.* respiratory

## Número de casos suspeitos e confirmados de Botulismo. Brasil, 1999 – 2014\*



Fonte: UVHA/DEVIT/SVS/MS \*Dados sujeitos a alteração.

## Casos confirmados de Botulismo segundo origem do alimento. Brasil, 1999-2014

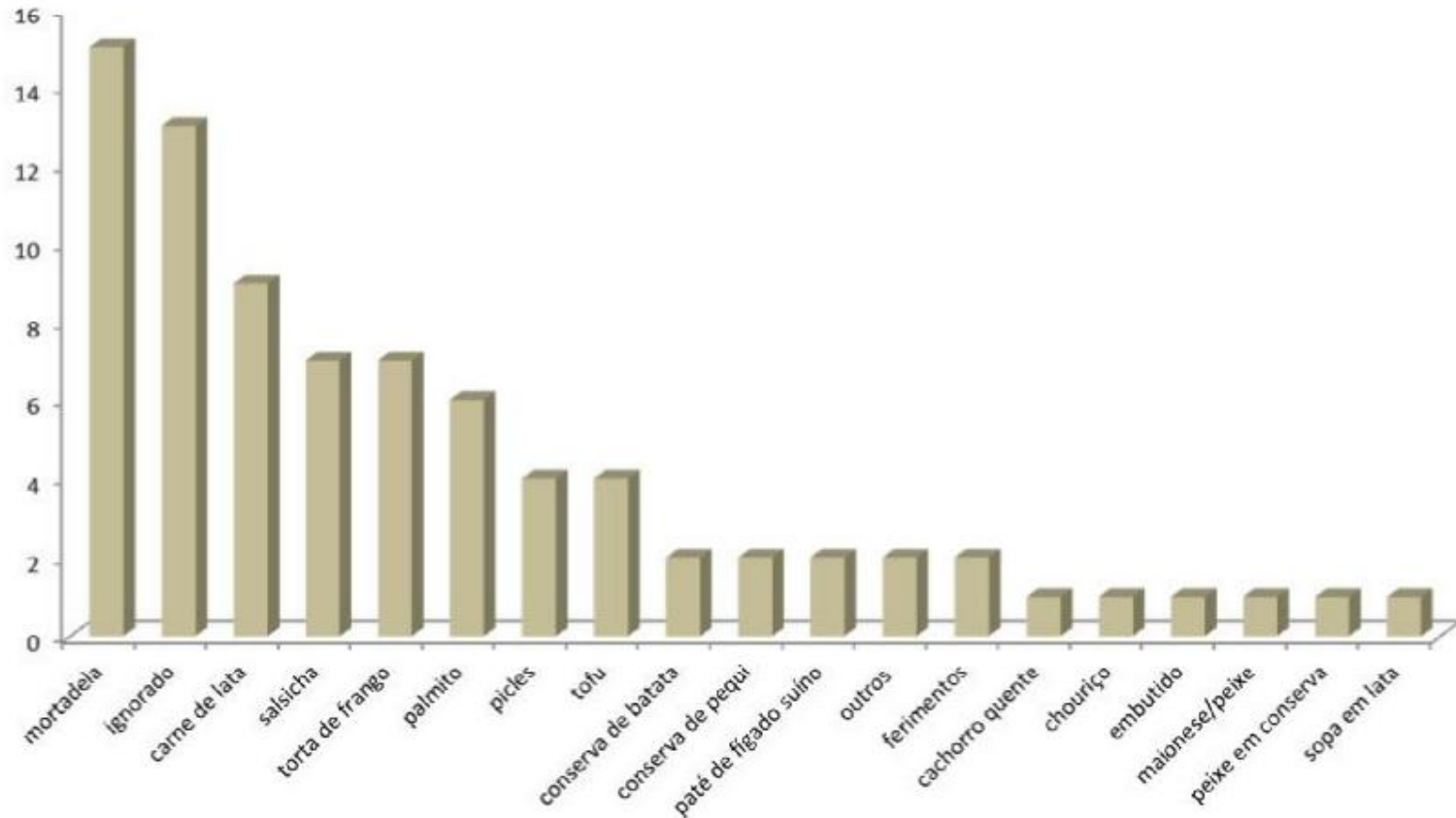


Fonte: Sinan-net . UVHA/CGDT/DEVIT/SVS/MS  
Dados atualizados em Junho de 2014



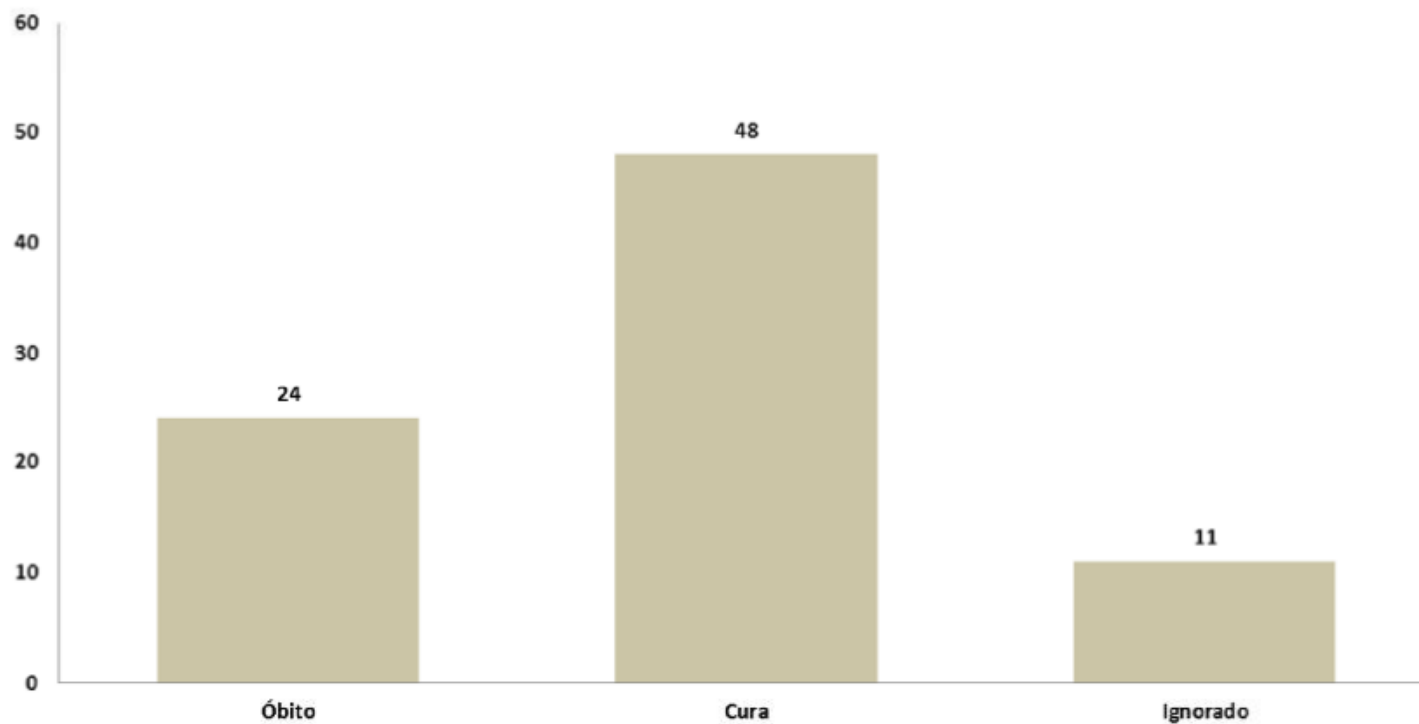
Ministério da  
Saúde

## Casos confirmados de Botulismo Alimentar segundo alimento envolvido. Brasil, 1999 a 2014 (\*)



Fonte: Sinan-net . UVHA/CGDT/DEVIT/SVS/MS  
Dados atualizados em Junho de 2014

## Número de casos por tipo de evolução. Brasil 1999 a 2014\*



Fonte: Sinan-net . UVHA/CGDT/DEVIT/SVS/MS  
Dados atualizados em Junho de 2014



Ministério da  
Saúde



# Botulismo no Estado de São Paulo São Paulo

## ☞ 2018 – Ribeirão Preto

- 3 casos distintos
  - Caso 1
  - turvação visual, náusea, vômitos, vertigem e diplopia, disartria e disfagia, progressivos.
  - acometimento de múltiplos nervos cranianos, tetraparesia proximal e sinais de disfunção autonômica (retenção urinária e fecal, dilatação pupilar). Sem alteração sensitiva (tátil, dolorosa ou vibratória)

# Botulismo no Estado de São Paulo São Paulo

## ☞ 2018 – Ribeirão Preto

- 3 casos distintos
  - Caso 2
  - tontura vertiginosa, vômito, progressivamente com diplopia, disfagia, disartria e tetraparesia, dispneia
  - acometimento de múltiplos nervos cranianos, tetraparesia proximal

# Botulismo no Estado de São Paulo São Paulo

## ☞ 2018 – Ribeirão Preto

- 3 casos distintos
  - Caso 3
  - diplopia, vertigem, disfonia e relato de disfagia para líquidos e tropeços durante a marcha, com piora progressiva.
  - ptose palpebral discreta a direita, força e sensibilidade preservados

# Botulismo no Estado de São Paulo São Paulo

👉 2018 – Ribeirão Preto

- Tratamento
  - Soro antibotulínico

# Botulismo no Estado de São Paulo São Paulo

👉 2018 – Ribeirão Preto

- Alimentos suspeito
  - Toffeta (tofu em conserva: óleo e especiarias)
    - Anaerobiose e não tem pH ácido
    - Comamor: produção caseira produtos veganos
      - » Irregular – autuada e fabricação interrompida



# Botulismo no Estado de São Paulo São Paulo

## 👉 2018 – Ribeirão Preto

- Desfecho

- Confirmada toxina botulínica - casos 1 e 2 (sem identificação do tipo)
- Presença *C. botulinum* e toxina tipo A na toffeta
- Confirmado surto – tofu em conserva
- Todos os casos receberam alta
  - Caso 1 e 2 – homecare
  - Caso 3 – fono

# Controle do botulismo

☞ Destruição dos esporos

# Controle do botulismo

## ☞ Destruição dos esporos

- Processamento térmico de alimentos  $\text{pH} \geq 4,6$



# Controle do botulismo

## Destruição dos esporos

- Processamento térmico de alimentos  $\text{pH} \geq 4,6$
- Irradiação

# Controle do botulismo

- ➔ Destruição dos esporos
- ➔ Controle do desenvolvimento

# Controle do botulismo

- ☞ Destruição dos esporos
- ☞ Controle do desenvolvimento
  - Refrigeração, congelamento

# Controle do botulismo

- ☞ Destruição dos esporos
- ☞ Controle do desenvolvimento
  - Refrigeração, congelamento
  - $a_w$

# Controle do botulismo

- ☞ Destruição dos esporos
- ☞ Controle do desenvolvimento
  - Refrigeração, congelamento
  - $a_w$
  - pH

# Controle do botulismo

- ☞ Destruição dos esporos
- ☞ Controle do desenvolvimento
  - Refrigeração, congelamento
  - $a_w$
  - pH
  - Nitrito de sódio

# Controle do botulismo

☞ Destruição dos esporos

☞ Controle do desenvolvimento

- Refrigeração, congelamento
- $a_w$
- pH
- Nitrito de sódio
- Defumação

# Controle do botulismo

- ➔ Destruição dos esporos
- ➔ Controle do desenvolvimento
- ➔ Destruição da toxina



# Controle do botulismo

- ➔ Destruição dos esporos
- ➔ Controle do desenvolvimento
- ➔ Destruição da toxina
  - calor

# Controle do botulismo

- ➔ Destruição dos esporos
- ➔ Controle do desenvolvimento
- ➔ Destruição da toxina
  - calor
  - cloro

# Comprovação de surto

## ☞ “Gold standard”

- Detecção da toxina
  - Soro / conteúdo gastro-intestinal
  - Recuperação de *C.bot* nas fezes
    - Podem ficar (+) por até 1 mês
- Detecção da toxina em alimentos suspeito
  - Ajuda na identificação da fonte
  - Evidência indireta de caso de botulismo

# Cuidados no laboratório

- ➔ Uso de luvas, máscara e óculos de proteção
- ➔ Trabalhos realizados sobre bandejas
- ➔ Evitar formação de aerossóis
- ➔ Neutralização da toxina com álcalis
  - na pele - solução saturada (10%) de  $\text{Ca}_2\text{CO}_3$
  - em superfícies - solução 0,1N de NaOH

# Detecção da toxina botulínica

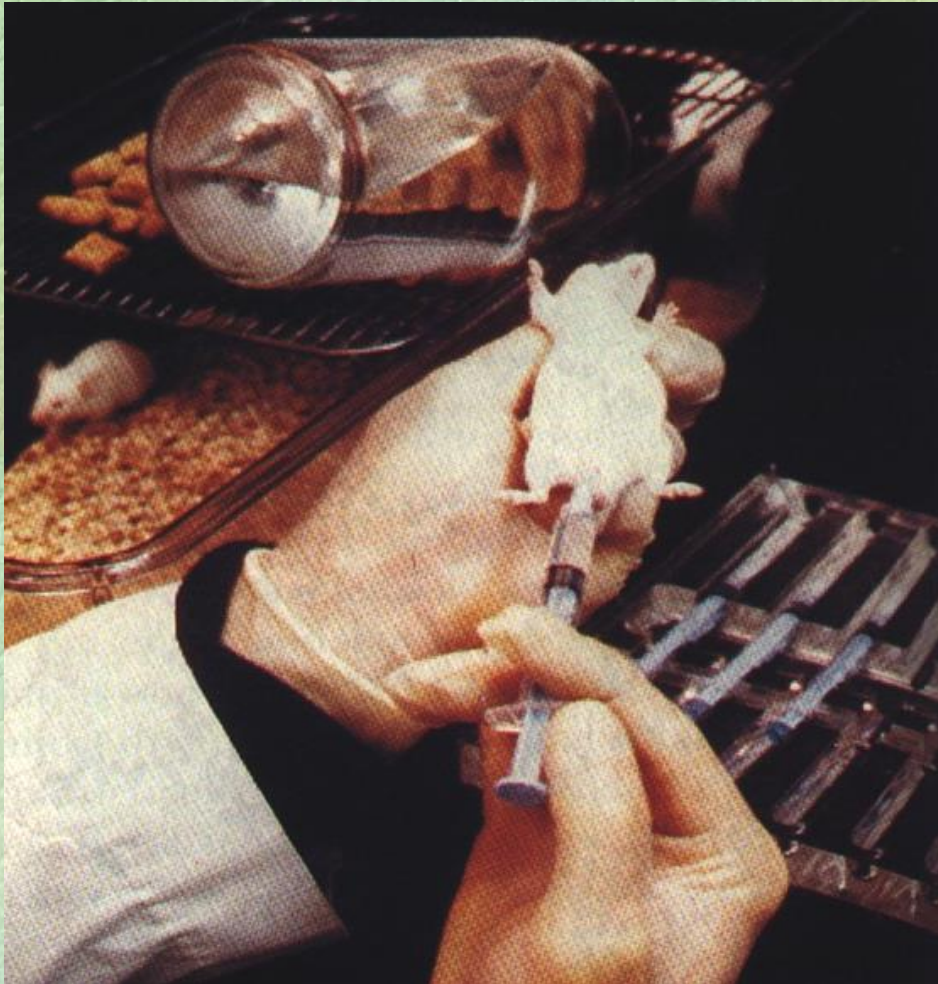
- ➔ Uso de luvas, máscara e óculos de proteção
- ➔ Trabalhos realizados sobre bandejas
- ➔ Evitar formação de aerossóis
- ➔ Neutralização da toxina com alcális
- ➔ Imunização com toxóide botulínico
  - CDC

# Detecção da toxina botulínica

## ☞ Principais amostras

- Alimento suspeito (10 – 50g)
- Soro sanguíneo (10 -15ml)
- Fezes (10 -50g)
- Conteúdo gástrico (10-50g)

# Bioensaio



**Teste mais sensível**

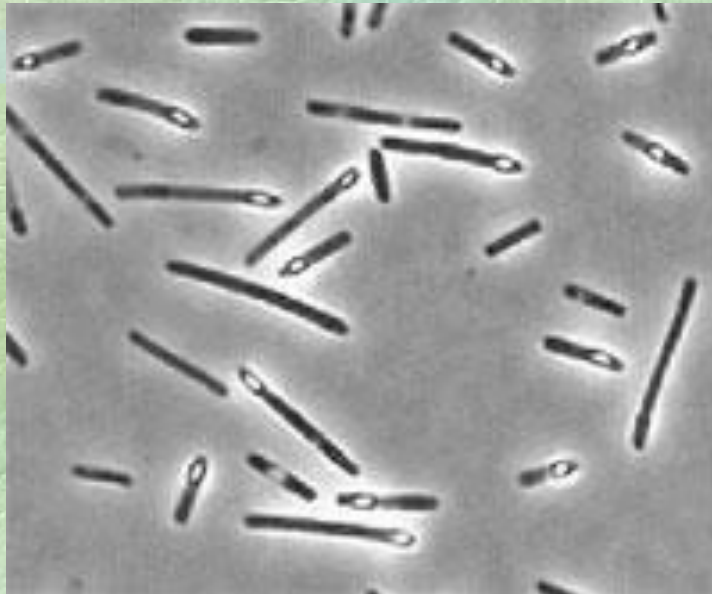
Nível de detecção

$\leq 1 \mu\text{g} / \text{ml}$

Período

4 dias (24 – 48h)

# ***Clostridium perfringens***





## *C. perfringens*

- ☞ 2 tipos de doença via alimentos
  - toxi-infecção por *C. perfringens* tipo A
  - enterite necrótica

# *C. perfringens*

- ☞ 2 tipos de doença via alimentos
  - toxi-infecção por *C. perfringens* tipo A
  - enterite necrótica
- ☞ 2 toxinas importantes ativas no TGI
  - enterotoxina do *C. perfringens* - CPE
  - $\beta$  toxina
    - Enterite necrótica

# Enterite necrótica

- ☞ *C. perfringens* tipo C
  - produtor de toxina  $\beta$

# Enterite necrótica

☞ *C. perfringens* tipo C

- produtor de toxina  $\beta$

☞ Doença entérica rara

- ocorre necrose da mucosa intestinal

# Enterite necrótica

☞ *C. perfringens* tipo C

- produtor de toxina  $\beta$

☞ Doença entérica rara

- ocorre necrose da mucosa intestinal
- atualmente restrita à Papua Nova Guiné
  - ligada ao consumo de refeições muito ricas em proteínas
  - usualmente suíno ("pig bel")

# Enterite necrótica

☞ *C. perfringens* tipo C

- produtor de toxina  $\beta$

☞ Doença entérica rara

- ocorre necrose da mucosa intestinal
- atualmente restrita a Papua Nova Guiné
  - ligada ao consumo de refeições muito ricas em proteínas
  - baixos níveis de proteases intestinais
    - ingestão de inibidores de proteases
    - dieta restrita

# Enterite necrótica

Adesão da bactéria às  
células da parede intestinal



produção de toxina  $\beta$   
(necrotizante)



necrose



gangrena ID



morte ← choque

tratamento

---

# Enterite necrótica





## *C. perfringens*

☞ Tempo de geração

- 10 min

## *C. perfringens*

☞ Tempo de geração

- 10 min

☞ Esporos altamente resistentes a

- radiação
- dessecação
- calor

## *C. perfringens*

- ☞ Tempo de geração
  - 10 min
- ☞ Esporos altamente resistentes a
  - radiação
  - dessecação
  - calor
- ☞ esporos formados por mecanismos ainda não completamente esclarecido

## *C. perfringens*

☞ Esporos altamente resistentes a

- radiação
- dessecação
- calor

☞ Anaeróbico

- início do desenvolvimento pode ocorrer em Eh(+)

## *C. perfringens*

☞ Esporos altamente resistentes a

- radiação
- dessecação
- calor

☞ Anaeróbio

- início do desenvolvimento pode ocorrer em Eh(+)
- substâncias do metabolismo tornarão Eh(-)

## *C. perfringens*

- ☞ Produzem 13 tipos diferentes de toxina
  - cada cepa produz somente 1 tipo de toxina

## *C. perfringens*

- ➡ Produzem 13 tipos diferentes de toxina
  - Cada cepa produz somente 1 tipo de toxina
- ➡ 4 delas usadas para tipagem das cepas
  - $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$

# *C. perfringens*

☞ 5 tipos

---

Tipo	toxina(s) produzida(s)
A*	$\alpha$
B	$\alpha, \beta, \varepsilon$
C♦	$\alpha, \beta, \gamma$
D♦	$\alpha, \varepsilon$
E	$\alpha, \gamma$

---

\* principal causador de toxi-infecção

♦ alguns surtos já relatados



# Reservatórios

- ➔ Amplamente distribuído na natureza
  - solo, poeiras
- ➔ presente no TGI de humanos ( $10^3 - 10^6$  UFC/g) e de animais

# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Temperatura

- 20 - 50 °C
- ótima 37 - 47 °C
- < 20 °C fase lag aumentada

# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Temperatura

- 20 - 50 °C
- ótima 37 - 47 °C
- < 20 °C fase lag aumentada

## ☞ Resistência térmica

# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Temperatura

- 20 - 50 °C
- ótima 37 - 47 °C
- < 20 °C fase lag aumentada

## ☞ Resistência térmica

- esporo
  - depende do ambiente
  - depende de fatores genéticos

# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Resistência térmica

- esporo
  - depende do ambiente
  - depende de fatores genéticos
- ambiente mais protetor
  - carne cozida
  - esporos sobrevivem a fervura por 1h ou +

# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Resistência térmica (esporo)

- ambiente mais protetor
  - carne cozida
  - esporos sobrevivem a fervura por 1h ou +
- cocção/aquecimento inadequado (80 °C/20 min)
  - esporos não destruídos
  - induz germinação
  - reduz a quantidade de O<sub>2</sub> no alimento

# Efeitos de fatores físicos e químicos

☞ cocção/aquecimento inadequado (80 °C/20 min)

- esporos não destruídos
- induz germinação
- reduz a quantidade de O<sub>2</sub> no alimento

☞ resistentes

- refrigeração
- congelamento

# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Resistência térmica (célula vegetativa)

- razoavelmente termo-resistente
- pouco resistentes a
  - refrigeração
  - congelamento



# Efeitos de fatores físicos e químicos

## ☞ Resistência térmica (célula vegetativa)

- razoavelmente termo-resistente
- pouco resistentes a
  - refrigeração
  - congelamento

## ☞ $a_w$

- pouco tolerantes a baixa  $a_w$
- min 0.93 - 0,97
  - varia com pH, soluto, T

# Efeitos de fatores físicos e químicos

☞  $a_w$

- pouco tolerantes a baixa  $a_w$
- min 0.93 - 0,97
  - varia com pH, soluto, T

☞ Eh

- - 45mv
- produz ferredoxinas que irão diminuir o Eh

# Gastrenterite

➔ Agente etiológico

- cepas toxigênicas de *C. perfringens*

# Gastrenterite

## ☞ Agente etiológico

- cepas toxigênicas de *C. perfringens*

## ☞ Dose infectante

- $>10^6$  -  $10^7$  UFC/g

# Gastrenterite

## ➡ Agente etiológico

- cepas toxigênicas de *C. perfringens*

## ➡ Dose infectante

- $>10^6$  -  $10^7$  UFC/g

## ➡ Período de incubação

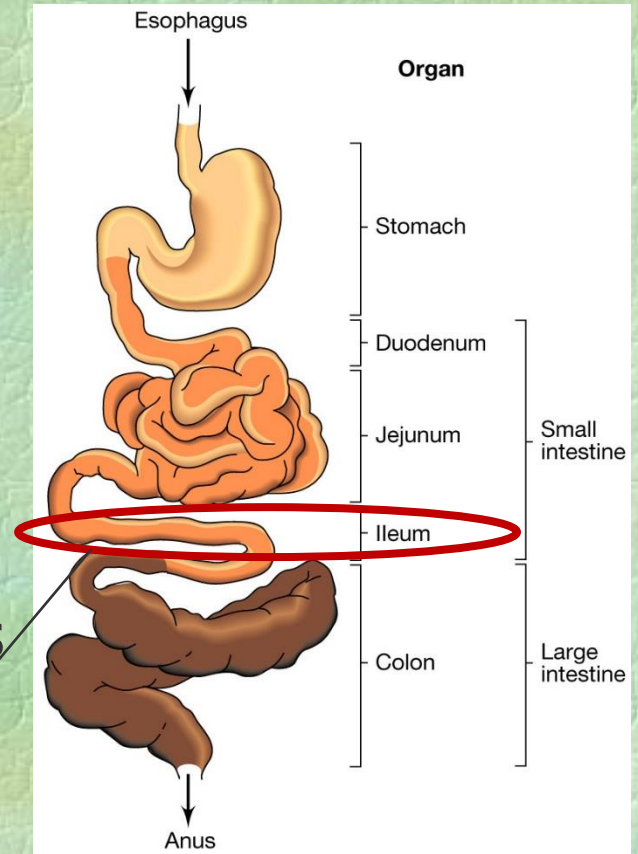
- 6 - 24h (média 8 - 12h)

# Gastrenterite

- 👉 Período de incubação
  - 6 - 24h (média 8 - 12h)

- 👉 Sintomas

- dores abdominais agudas
- diarréia
- gases
- febre, náusea e vomitos - raros
- suave e autolimitada



Parte mais sensível do intestino delgado ao *C. perfringens*

# Gastrenterite

## ☞ Sintomas

- dores abdominais agudas
- diarreia
- gases
- febre, náusea e vômitos - raros

## ☞ Duração

- 12 - 24h

# Gastrenterite

➡ Duração

- < 1 dia

➡ Não envolve imunidade



# Gastrenterite

➡ Não envolve imunidade

➡ Fatalidade

- baixa
- pode causar problemas em idosos e debilitados

# Gastrenterite

## ☞ Fatalidade

- baixa
- pode causar problemas em idosos e debilitados

## ☞ Surtos

- somente relatados quando envolvem grande número de pessoas

# Gastrenterite

## ☞ Fatalidade

- baixa
- pode causar problemas em idosos e debilitados

## ☞ Surtos

- somente relatados quando envolvem grande número de pessoas
- usualmente ligados a refeições coletivas

# Gastrenterite

## ☞ Surtos

- somente relatados quando envolvem grande número de pessoas
- usualmente ligados a refeições coletivas

## ☞ Alimentos envolvidos

- pratos à base de carnes
- alimentos preparados
  - em grandes porções
  - com antecedência
  - abuso de temperatura

# Principais causas de surtos

## ☞ Abuso de temperatura

- armazenamento
- manutenção a quente

# Principais causas de surtos

## ☞ Abuso de temperatura

- armazenamento
- manutenção a quente

## ☞ Cocção inadequada

# Principais causas de surtos

## ☞ Abuso de temperatura

- armazenamento
- manutenção a quente

## ☞ Cocção inadequada

## ☞ Equipamentos contaminados

# Principais causas de surtos

## ☞ Abuso de temperatura

- armazenamento
- manutenção a quente

## ☞ Cocção inadequada

## ☞ Equipamentos contaminados

## ☞ Higiene pessoal inadequada



# Principais causas de surtos

- ➔ Abuso de temperatura
  - armazenamento
  - manutenção a quente
- ➔ Cocção inadequada
- ➔ Equipamentos contaminados
- ➔ Higiene pessoal inadequada
- ➔ Preparo de grandes porções

# Medidas de prevenção e controle

## ☞ Cocção adequada

- principalmente porções grandes

# Medidas de prevenção e controle

☞ Cocção adequada

- principalmente porções grandes

☞ Resfriamento rápido de alimentos já cozidos

# Medidas de prevenção e controle

## ☞ Cocção adequada

- principalmente porções grandes

## ☞ Resfriamento rápido de alimentos já cozidos

## ☞ Armazenamento a

- $< 7\text{ }^{\circ}\text{C}$
- $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$

# Identificação do surto

☞  $>10^5$  cels/g de alimento

# Identificação do surto

➡  $> 10^5$  cels/g de alimento

➡  $> 10^6$  cels/g de fezes dos doentes

# Identificação do surto

- ➡  $>10^5$  cels/g de alimento
- ➡  $> 10^6$  cels/g de fezes dos doentes
- ➡ mesmo sorotipo de *C. perfringens* em todos os doentes

# Identificação do surto

- ➡  $>10^5$  cels/g de alimento
- ➡  $> 10^6$  cels/g de fezes dos doentes
- ➡ mesmo sorotipo de *C. perfringens* em todos os doentes
- ➡ mesmo sorotipo no alimento e nas fezes



☞ Atualmente se sabe que:

- idosos apresentam populações mais elevadas de *C. perfringens* nas fezes

☞ Atualmente se sabe que:

- idosos apresentam populações mais elevadas de *C. perfringens* nas fezes
- >ria dos *C. perfringens* não podem ser tipados com soros comerciais

☞ Apenas 5% das cepas ambientais possuem o gene *cpe*

- ∴ poucas cepas enterotoxigênicas

☞ Apenas 5% das cepas ambientais possuem o gene *cpe*

- ∴ poucas cepas enterotoxigênicas

☞ *cpe*

- plasmidial em *C. perfringens* de origem animal
- cromossômico em cepas isoladas de toxi-infecções alimentares

☞ *cpe*

- plasmidial em *C. perfringens* de origem animal
- cromossômico em cepas isoladas de toxi-infecções alimentares

☞ ∴ ∃ 2 populações de *Cp cpe+* mas somente a cromossômica pode causar doenças em humanos

☞ *cpe*

- plasmidial em *C. perfringens* de origem animal
- cromossômico em cepas isoladas de toxi-infecções alimentares

☞ ∴ ∃ 2 populações de *Cp cpe+* mas somente a cromossômica pode causar doenças em humanos

☞ Pesquisar *Cp* ou *Cp cpe+* ????

# Toxina

☞ Proteína específica do esporo

# Toxina

- ➔ Proteína específica do esporo
- ➔ Produzida durante a esporulação "*in vivo*"



# Toxina

- ➔ Proteína específica do esporo
- ➔ Produzida durante a esporulação "*in vivo*"
- ➔ Liberada na lise celular

# Toxina

- ➔ Proteína específica do esporo
- ➔ Produzida durante a esporulação
- ➔ Liberada na lise celular
- ➔ Citotóxica

# Toxina

- ➔ Proteína específica do esporo
- ➔ Produzida durante a esporulação
- ➔ Liberada na lise celular
- ➔ Citotóxica
- ➔ PM 35 kDa

# Toxina

- ➔ Produzida durante a esporulação
- ➔ Liberada na lise celular
- ➔ Citotóxica
- ➔ PM 35 kDa
- ➔ Termosensível
  - 60 °C/10 min

# Toxina

- ➔ Liberada na lise celular
- ➔ Citotóxica
- ➔ PM 35 kDa
- ➔ Termosensível
  - 60 °C/10 min
- ➔ Sensível à pronase

# Toxina

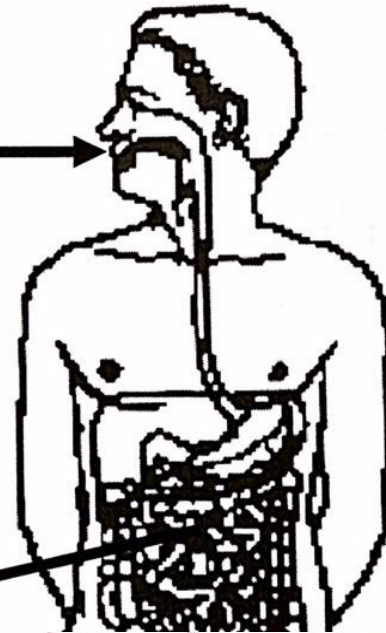
- ➔ Citotóxica
- ➔ PM 35 kDa
- ➔ Termosensível
  - 60 °C/10 min
- ➔ Sensível à pronase
- ➔ Resistente à
  - tripsina
  - quimiotripsina
  - papaína

# *Clostridium perfringens* Food Poisoning

Vegetative *cpe*<sup>+</sup>  
*C. perfringens*



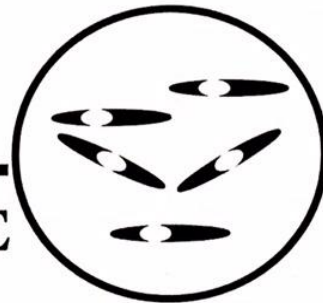
Food Source



INTESTINAL VILLI  
CPE -      CPE +



CPE



Sporulation of  
*C. perfringens*

DIARRHEA and CRAMPS



## Toxina - Modo de ação

Ligação toxina - borda em escova das células  
epiteliais do intestino  
(ligação irreversível)



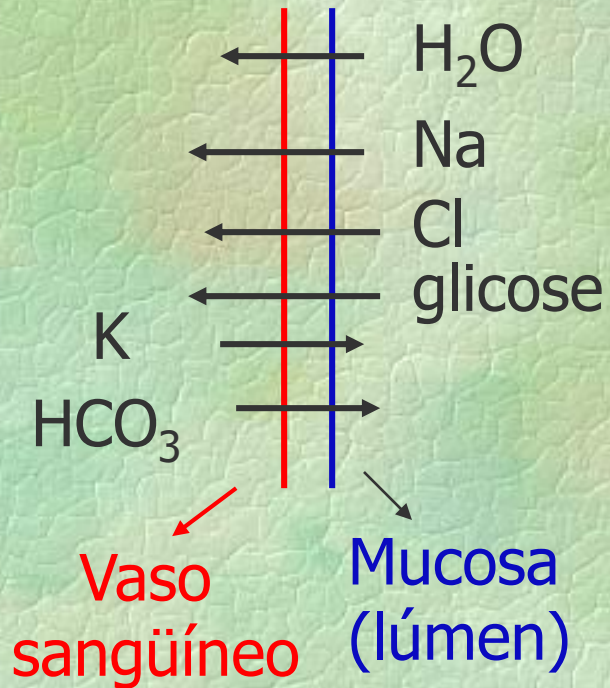
Internalização



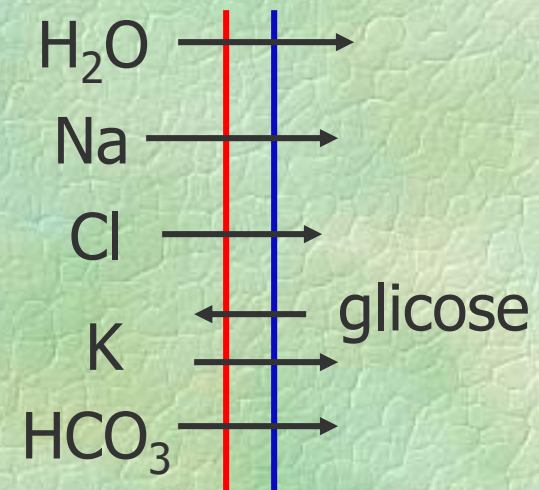
Alteração da permeabilidade  
da membrana



## Íleo normal



## Íleo c/ enterotoxina



# Bibliografia

- ➔ Johnson, E.A. *Clostridium botulinum*. In: Doyle , M.P.; Beuchat,L. Food Microbiology Fundamentals and frontiers. 3rd ed. ASM, Washington, DC. 2007 p.401-421.
- ➔ McClane, B.A. *Clostridium perfringens*. In Doyle, M.P.; Beuchat, L. Food Microbiology Fundamentals and frontiers. 3rd ed. ASM, Washington, DC. 2007 p.423-444.
- ➔ Rossetto, O.; Pirazzini, M.; Montecucco, C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. Nature Rev. Microb; published online 30 June 2014; doi:10.1038/nrmicro3295
- ➔ Smedley III, J.G.; Saputo, J.; Parker, J.C.; Fernandez-Miyakawa,M.E.; Robertson, S.L.; McClane, B.A.; Uzal, F.A. Noncytotoxic *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) variants localize CPE intestinal binding and demonstrate a relationship between CPE-induced cytotoxicity and enterotoxicity. Inf. Immun. 76:3793-3800,2008.