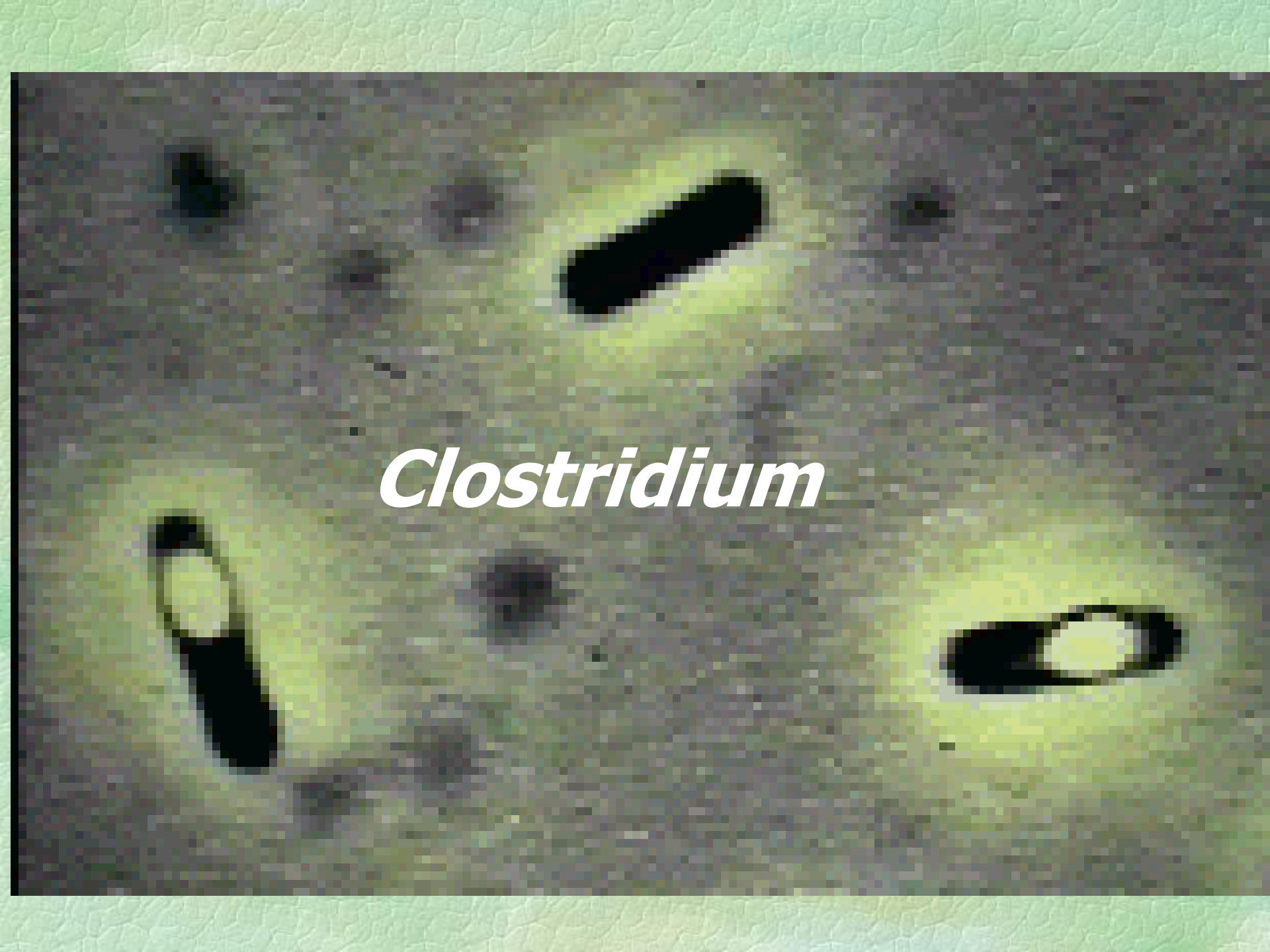
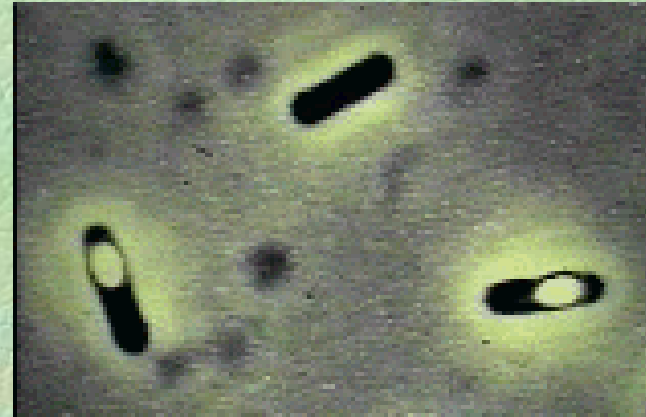


A microscopic image showing several Clostridium bacteria. The bacteria are rod-shaped and appear in various orientations. Some are single, while others are in pairs or small groups. The background is a mottled, light brown color. The word "Clostridium" is written in a stylized, italicized font across the center of the image.

Clostridium

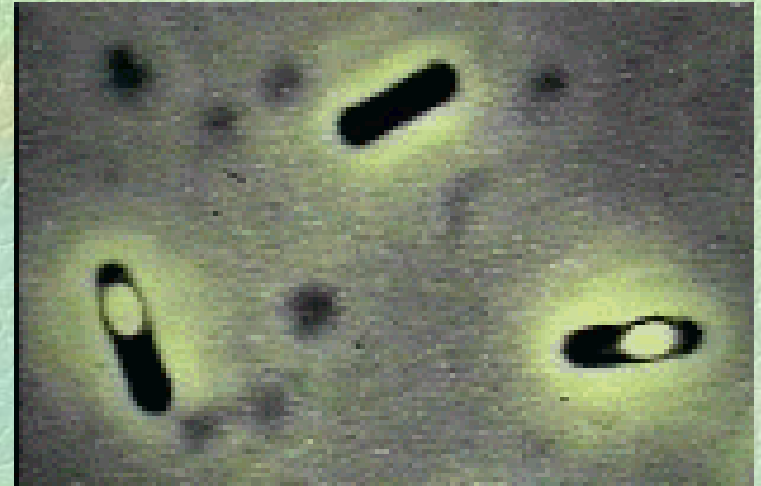
Sistemática

- Ordem: *Clostridiales*
- Família: Clostridiaceae
 - Gênero
 - *Clostridium*



Características

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



□ *Clostridium*: mais de 150 sp

□ Patogênicas

- *C. botulinum**
- *C. baratii**
- *C. butyricum**
- *C. tetani*

Cluster I: *Clostridium sensu stricto*
sp tipo: *Cl. butyricum* Prazmowski

– Neurotoxina

» Paralisia tetânica

- *C. difficile*: atualmente *Clostridioides difficile*
- *C. perfringens*
- *C. sordelli*: infecção pós parto, pós aborto espontâneo ou não.

*BoNT

- ▣ **ENVOLVIDAS EM DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR**

- ▣ ***C. botulinum***

- ▣ ***C. perfringens***

- ▣ Outras espécies

- ▣ *C. baratii**

- ▣ *C. butyricum**

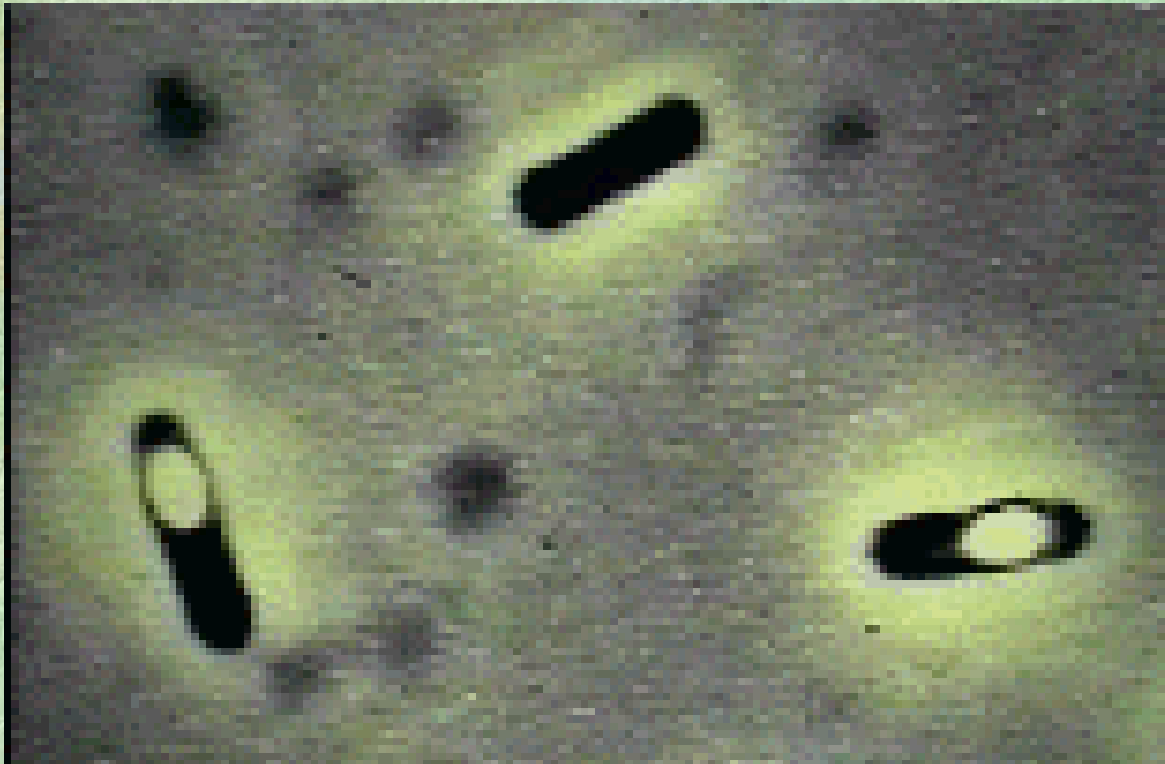
□ 2 espécies envolvidas em doenças de origem alimentar

- *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
- ❑ Tipos de botulismo
- ❑ Sintomas do 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



Figure 18.1 Characteristic morphology of *C. botulinum* with an endospore.

doi:10.1128/9781555819972.ch18

Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

□ Eh

□ Ótimo baixo

- -350mv máximo desenvolvimento
- +30 a +250 permite início da multiplicação
- Nível crítico de O_2 previne germinação e multiplicação
 - 1-2%
- Nível de O_2 : difícil de controlar no alimento
 - Multiplicação da microbiota.
 - » Altera o nível de O_2

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

□ CO₂

- Aumenta a acidez no alimento
 - Impede a germinação do esporo

Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

□ Atmosfera envolvendo o alimento

- Redução de O_2 e aumento CO_2 → pode ser permissiva → multiplicação de *C. botulinum* e produção de toxina
 - risco depende não apenas do gás presente na atmosfera envolvendo o alimento, mas tb do produto, T de armazenamento, filme utilizado, e microbiota competitiva. (Em alimentos refrigerados!!!) Grupo II *C. bot.* (não proteolíticos)
- Obs.: embalagem a vácuo inibe multiplicação de deteriorantes, facilitando multiplicação de *C. botulinum*

Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

□ Alguns ex. de alteração na conc. de O_2 problemáticos

- Filme de alta barreira a O_2 e vegetais que respiram
 - Cogumelos pré –embalados: o filme de alta barreira reduziu a concentração de O_2 devido à respiração dos cogumelos e permitiu a produção da toxina botulínica .
 - Detectada após 3d de armazenamento e os cogumelos estavam aceitáveis, sensorialmente.
 - Solução para prevenir a prod. da toxina: fazer 3 a 4 furos na embalagem para troca gasosa.

Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

- Alguns ex. de alteração na conc. de O_2 problemáticos
 - Embalagem de alho em óleo: baseou apenas na refrigeração
 - Surto e alterações na exigência de formulação regulatória.

Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

□ Resumindo

- A inibição da multiplicação de *C. botulinum* e produção da toxina não pode se basear apenas nas baixas concentrações de O_2
- Efeito dos componentes do alimento
 - Sufidrilas ou microbiota competitiva
 - Tb podem reduzir o Eh

□ Portanto:

- **PROCESSAMENTO ADEQUADO E INCLUSÃO DE BARREIRAS SECUNDÁRIAS SÃO RECOMENDADAS**

Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

□ Conservantes

- Nitrito de sódio
 - efetivo
- Nitrato de sódio
 - Inefetivo
- Exemplo de uso
 - Produto cárneo curado: presunto cozido, mortadela
 - Solução de cura: nitrato/nitrito + NaCl
 - » Às x: açúcar para bactérias $\text{NO}_3 \longrightarrow \text{NO}_2$

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 multiplicação e resistência relevantes das cepas produtoras de 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. multiplicação (°C)						
Minima	10	3	15	12	10	20
Ótima	35-40	18-25	35-40	30-37	30-37	30-40
Máxima	45-50	40-45	NA	45	~40	NA
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°C} esporos (min)	~ 2,5	<0,1	NA	NA	NA	NA
D _{121°C} esporos (min)	0,21	<0,005				

Hospedeiros primários, localização dos genes das toxinas nos sorotipos de A - G de *C. botulinum* e localização geográfica dos esporos

Sorotipo	Espécies sensíveis	Localização do gene de toxina	Localização geográfica dos esporos (solo)
A	Humanos e cavalos	Cromossoma, gdes plasmídeos em algumas cepas	Oeste EUA; China; Brasil, Argentina
B	Humanos, cavalos, suínos e primatas	Igual ao anterior	Este EUA (proteolítica); UK; Europa continental (não proteolítica)
C	Pássaros, cavalos, gado, cães, tartarugas	Bacteriófago pseudolisogênico	Regiões mais quentes
D	Gado	Igual ao anterior	Regiões mais quentes
E	Pescado, aves aquáticas	Cromossoma, gdes plasmídeos em algumas cepas	Regiões frias e águas temperadas
F	Humanos (raro)	Idem	
G	Desconhecido	Grandes plasmídeos	

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



Bebê com paralisia flácida característica de botulismo Matthews et al. Food Microbiology: an introduction

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

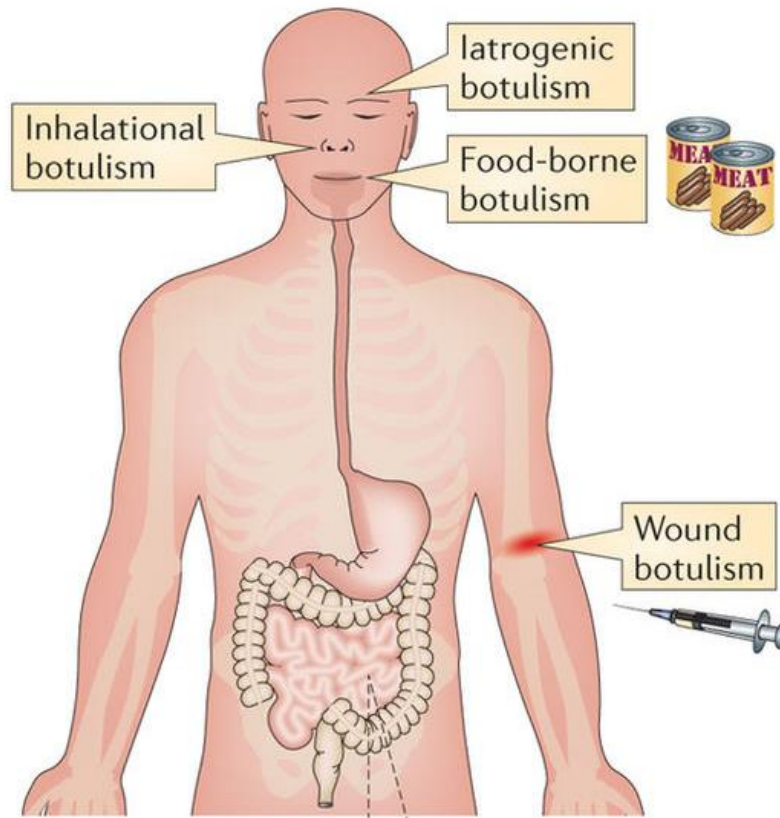
- tipo muito raro
- ocorre quando muita toxina botulínica é injetada seja por razões cosméticas ou médicas, como enxaquecas.

□ Por inalação

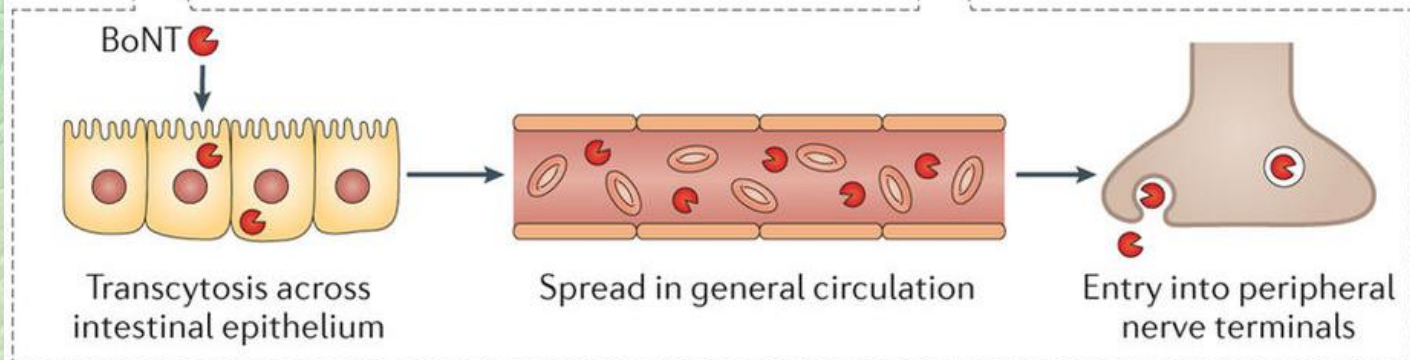
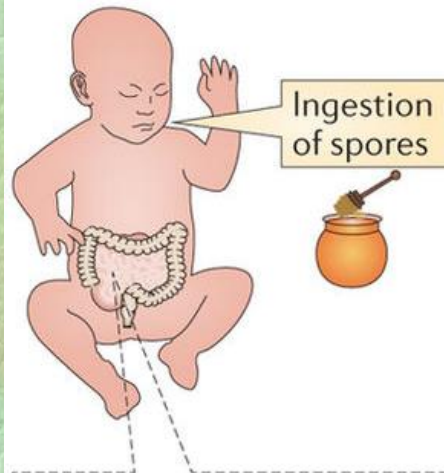
- Acidental ou intencional (Bioterrorismo)
 - Semelhante ao infantil

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 <i>C. argentinense</i>	V <i>C. butyricum</i>	VI <i>C. baratii</i>
	I proteolítico	II não- proteolítico	III			
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 _w inibitória	0,94	0,97	NA	NA	?	NA
[NaCl] inibit. %	10	5	3	>3	NA	5
D _{100°C} esporos (min)	~ 2,5	<0,1	NA	NA	NA	NA
D _{121°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
 - Dificuldade na deglutição e no controle da língua
 - Fadiga, falta de coordenação motora
 - Paralisia progressiva
 - 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
 - CO₂
 - Organofosforados
- Eletroneuromiografia permite a exclusão de outras síndromes

Botulismo

□ Tratamento

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

Botulismo

- Recuperação total
 - Vários meses
 - paralisia parcial
 - 8 meses

Botulismo

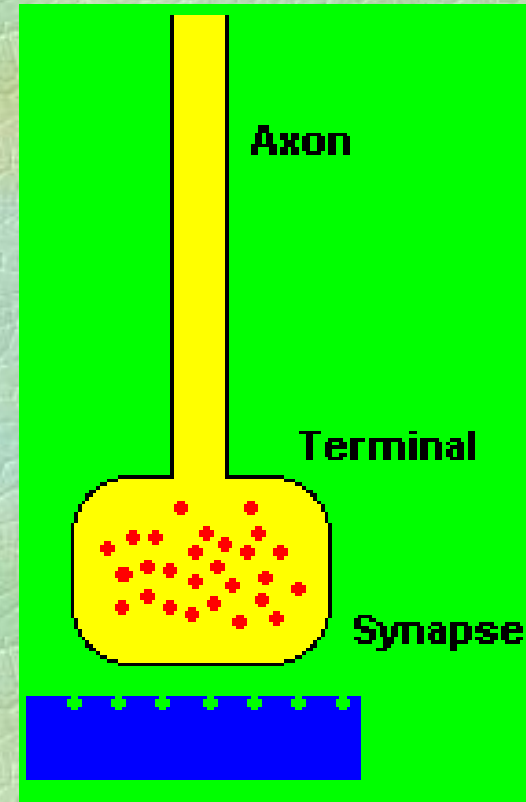
- Agente causal
 - Neurotoxina
 - Natureza proteica
 - ∴ Antigênica
 - Alta toxicidade

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

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

Cadeia Pesada (H chain)– 100kDa

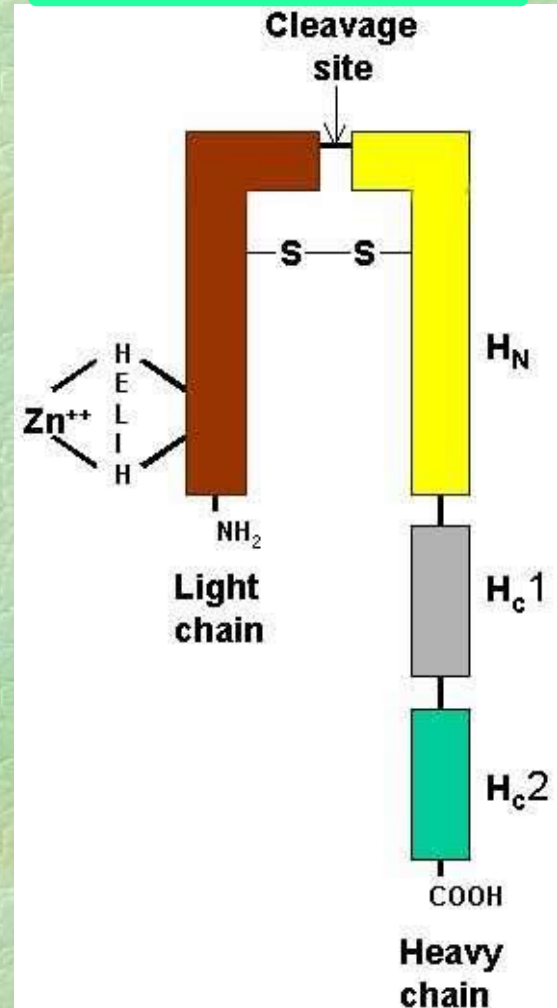
Vários domínios: funções diferentes

Para ter ação: toxina precisa ser clivada

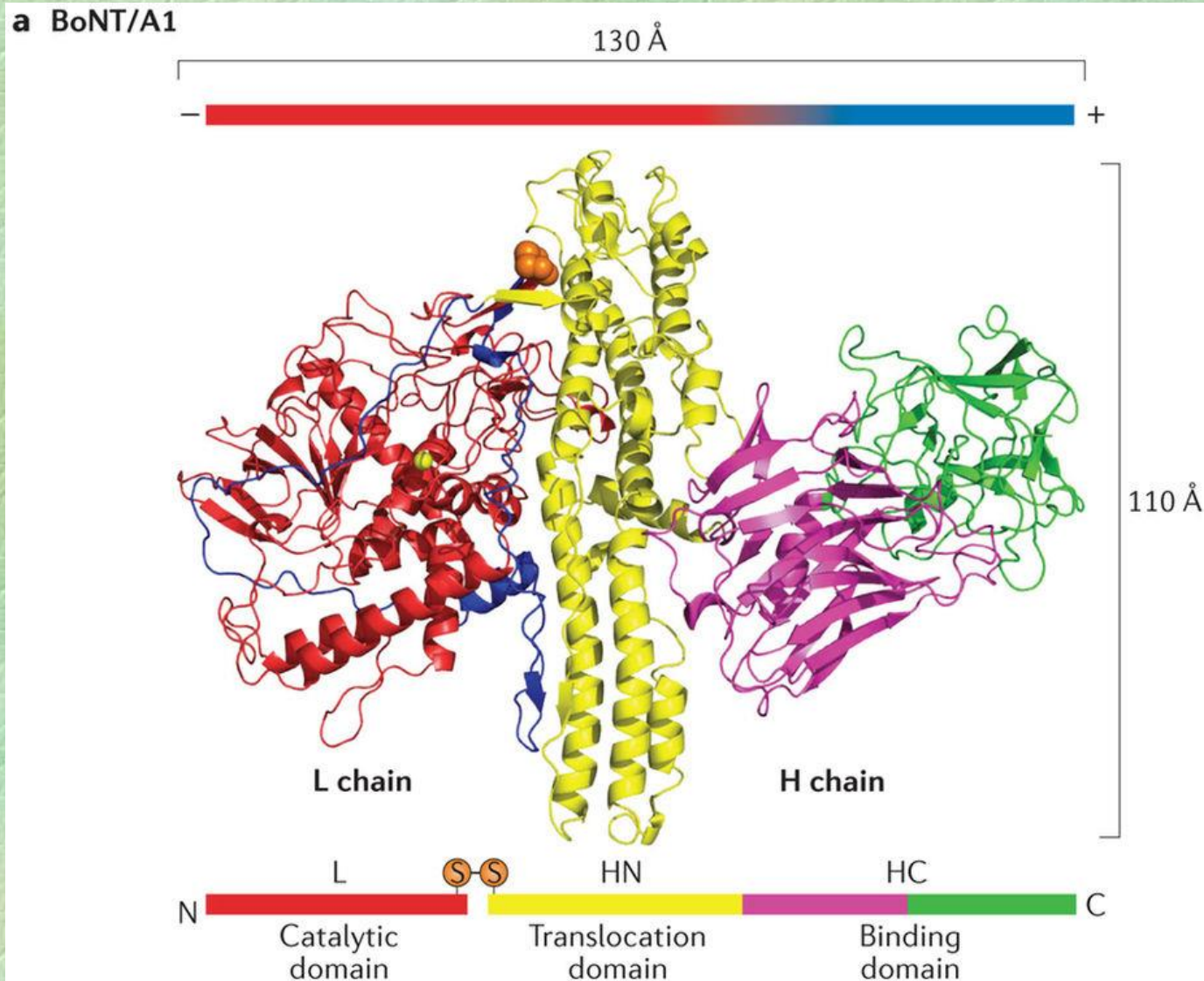
Grupo I prot. (A, B, F): clivada por enz. proteolíticas de cél. veg.

Grupo II não prot. (B, E, F): clivada por enz. proteolíticas produzidas pelo intestino humano

L + H ponte di-sulfeto



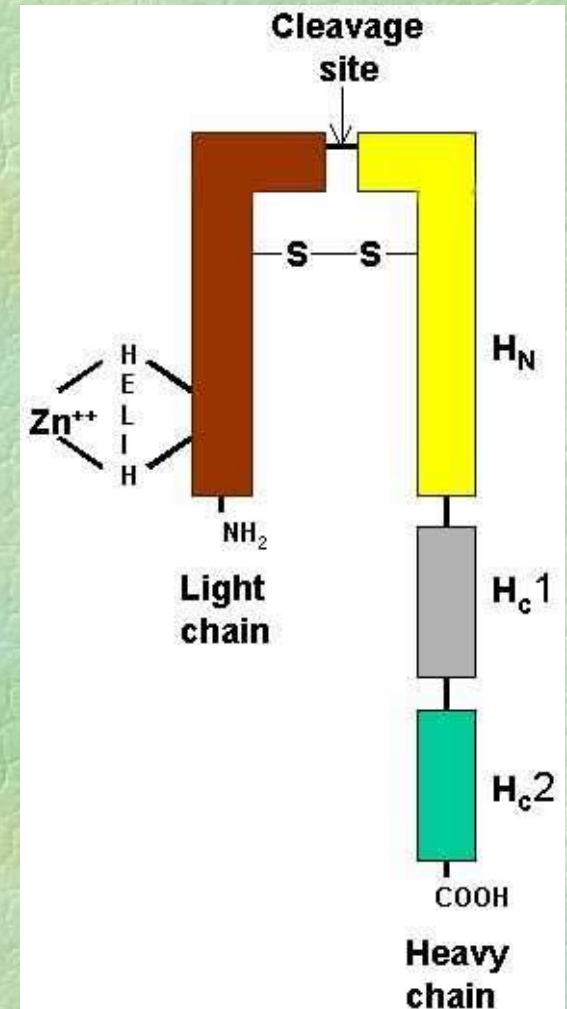
Toxina Botulínica



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

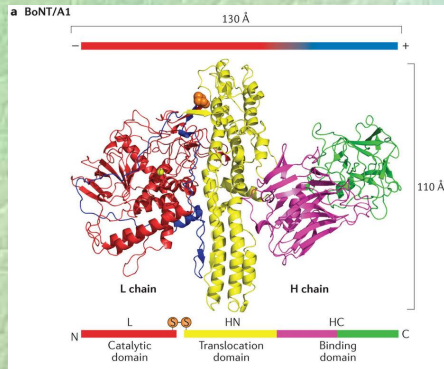
□ Varia com sorotipo

- BoNTs A, B, E e F e prot não tóxicas associadas
 - Cromossomais
- BoNTs C₁ e D e prot não tóxicas associadas
 - Bacteriófagos
- BoNT G
 - Plasmidial

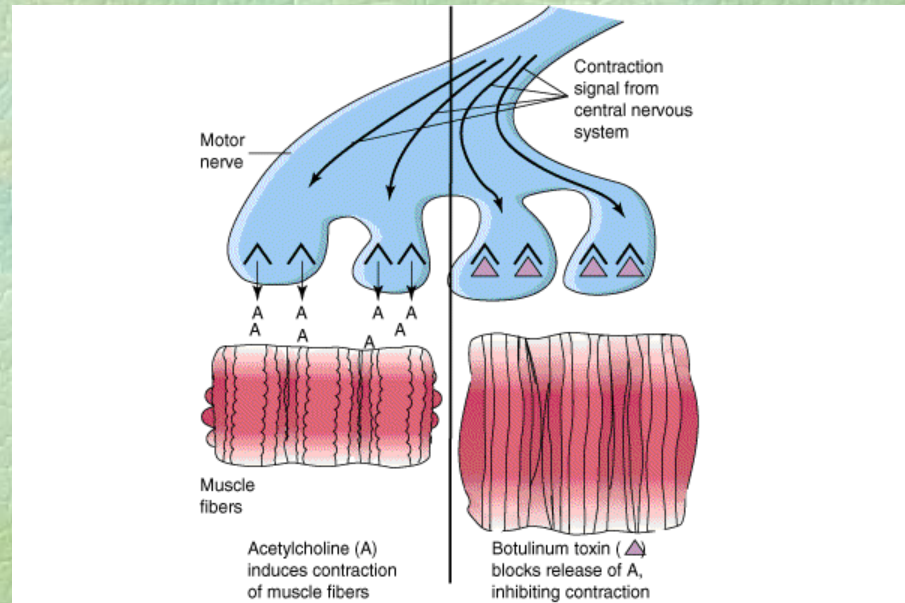
Clostridial species	Proteolytic <i>C. botulinum</i> group I	Non-proteolytic <i>C. botulinum</i> group II	<i>C. botulinum</i> group III	<i>C. argentinense</i> (group IV)	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Type	A; B; F; (H)*	B; E; F	C; D	G	E	F
Subtype	A1; A2; A3; A4; A5; A6; A7; A8; A9; A10; B1; B2; 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



Nature Reviews Microbiology



Modo de ação: 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.

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 com alho



Botulismo

- Alimentos usualmente envolvidos
 - comercialmente processados
 - Restaurantes
 - Alimentos procesados
 - com pH >4,6
 - » “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)

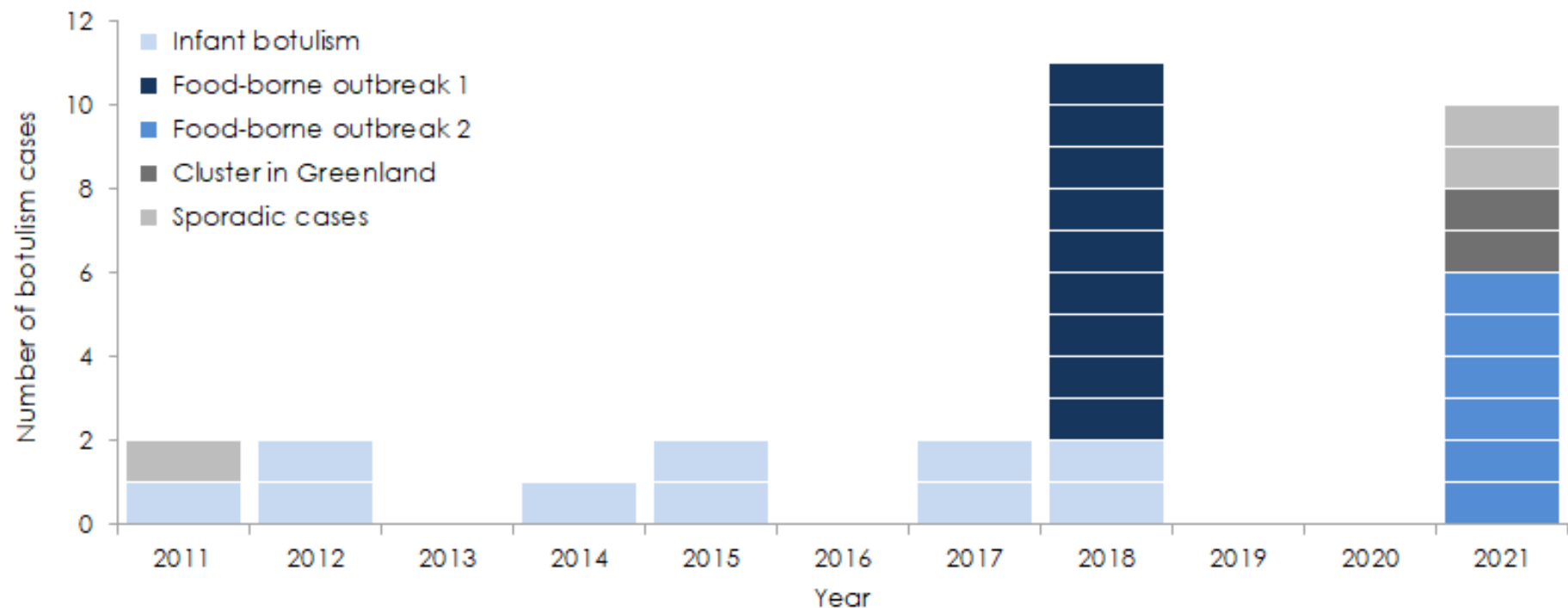
- Mesma marca, lote diferente da Georgia

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

Figure 1. Botulism cases registered in Denmark, 2011-21, n = 30*



*Please note: The two Greenlandic cases from 2021 are not counted in the Danish botulism surveillance, but were included in this presentation as the diagnostics were conducted at Statens Serum Institut.

<https://en.ssi.dk/news/epi-news/2021/no-45---2021>

2011: 1 caso sexo M: alimento tofu

2018: 9 casos (1º surto relatado)/9 hospitalizados com 6 resp. artificial/0 óbito
Alimento: conserva de camarão e ovas de peixe com borda de gelatina

2021: 1 caso/1 óbito

Alimento: peixe ou repolho fermentado

2021: 9 casos/1 óbito

Alimento: carne de foca embalada em saco plástico (fez anaerobiose) toxina tipo E detectada no alimento em um dos casos

Outro caso (6 casos): toxina tipo A detectada em conserva de peixe feita em casa

Botulismo na Alemanha (2018)

- 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

Botulismo no Estado de São Paulo

2018 – Ribeirão Preto – 3 casos distintos

	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Sintomas	turvação visual, náusea, vômitos, vertigem e diplopia, disartria e disfagia, progressivos.	tontura vertiginosa, vômito, progressivamente com diplopia, disfagia, disartria e tetraparesia, dispneia	diplopia, vertigem, disfonia e relato de disfagia para líquidos e tropeços durante a marcha, com piora progressiva.
	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)	acometimento de múltiplos nervos cranianos, tetraparesia proximal	ptose palpebral discreta à direita, força e sensibilidade preservados

Botulismo no Estado de São Paulo

□ 2018 – Ribeirão Preto

□ Tratamento

- Soro antibotulínico

Botulismo no Estado de 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
 - Processamento térmico de alimentos $\text{pH} \geq 4,6$
 - Irradiação

Controle do botulismo

- Destruição dos esporos
- Controle da germinação dos esporos
 - Refrigeração, congelamento
 - a_w
 - pH
 - Nitrito de sódio
 - Defumação

Controle do botulismo

- ☐ Destruição dos esporos
- ☐ Controle da germinação dos esporos
- ☐ Destruição da toxina

Controle do botulismo

- Destruição dos esporos
- Controle da germinação dos esporos
- 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 Ca_2CO_3
 - em superfícies - solução 0,1N de NaOH

Detecção da toxina botulínica

□ Principais amostras

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

Bioensaio



Teste mais sensível

Nível de detecção

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

Período

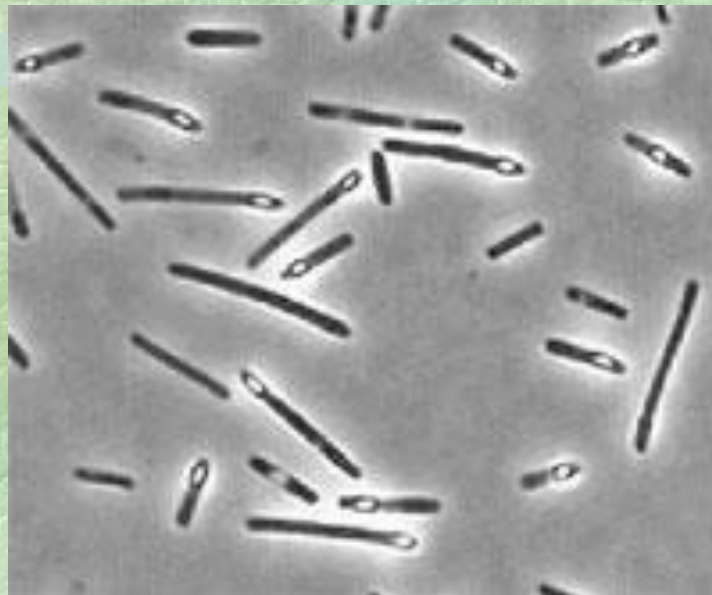
4 dias (24 – 48h)

Bibliografia

- Johnson, E.A. *Clostridium botulinum*. In: Doyle , Diez-Gonzalez, F., Hill, C.- Diaz, C. Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. 5th. ed. ASM, Washington, DC. 2019 p.487-512. doi:10.1128/9781555819972.ch18
- 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



Clostridium perfringens

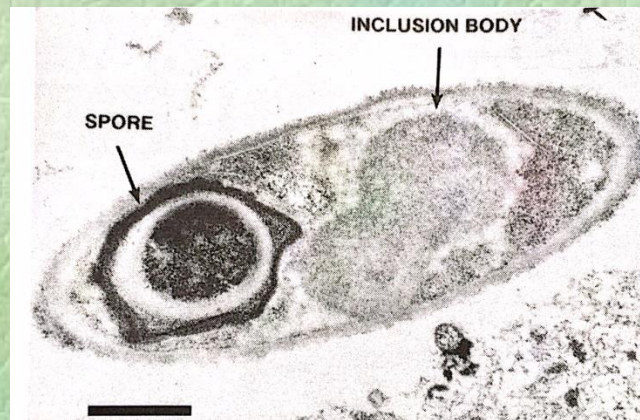


Objetivos da aula

- Entender sobre as principais características do *C. perfringens*
- Entender as condições que favorecem a germinação do esporo e multiplicação da célula vegetativa
- Entender os principais sintomas da toxi-infecção
- Entender sobre o mecanismo de patogenicidade
- Saber aplicar medidas preventivas e de controle em alimentos

C. perfringens

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



C. perfringens

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

- 2 toxinas importantes ativas no TGI
 - enterotoxina do *C. perfringens* - CPE
 - β toxina
 - Enterite necrótica

Enterite necrótica

- *C. perfringens* tipo C
 - produtor de toxina β

Enterite necrótica

- *C. perfringens* tipo C
 - produtor de toxina β
- Doença entérica rara
 - ocorre necrose da mucosa intestinal

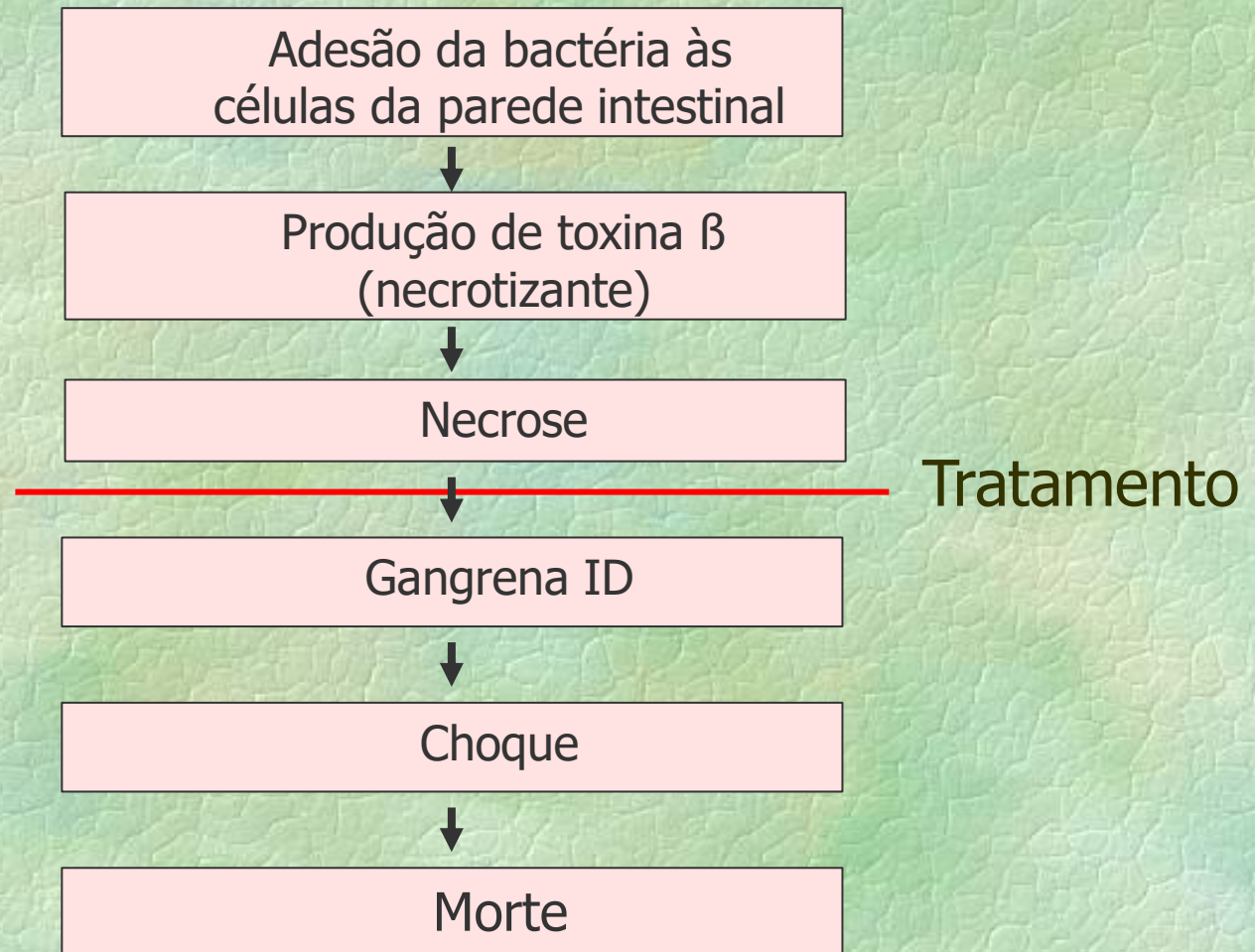
Enterite necrótica

- *C. perfringens* tipo C
 - produtor de toxina β
- Doença entérica rara
 - ocorre necrose da mucosa intestinal
 - Papua Nova Guiné e Vietnam
 - ligada ao consumo de refeições muito ricas em proteínas por pessoas subnutridas
 - Usualmente proteína de origem animal - suíno ("pig bel")

Enterite necrótica

- *C. perfringens* tipo C
 - produtor de toxina β
- 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



Enterite necrótica



C. perfringens

- Tempo de geração
 - 8-10 min

C. perfringens

□ Tempo de geração

- 10 min

□ Esporos

- Formados por mecanismos ainda não completamente esclarecido
- Altamente resistentes
 - Radiação
 - Dessecação
 - Calor
 - Refrigeração
 - Congelamento

C. perfringens

- Esporos altamente resistentes a
 - radiação
 - dessecação
 - calor
- Anaeróbico
 - início do desenvolvimento pode ocorrer em Eh(+)
 - substâncias do metabolismo tornarão Eh(-)

C. perfringens

- Produzem +20 tipos diferentes de toxina ou enzimas → mas 6 principais são usadas para classificar as cepas em 7 toxinotipos
 - cada cepa só é classificada em um toxinotipo (até o momento).

Principais toxinas produzidas pelos sete toxinotipos de *C. perfringens*

Toxinotipo	Principais toxinas						
	Alfa (α) fosfolipase	Beta (β) necrotizante	Épsilon (ϵ) permease	Iota (ι) ribosilação ADP	CPE enterotoxina	Net B	
A	+	-	-	-	-	-	Gangrena gasosa
B	+	+	+	-	-	-	Doença entérica em animais
C	+	+	-	-	+/-	-	Doença entérica em animais
D	+	-	+	-	+/-	-	Doença entérica em animais
E	+	-	-	+	+/-	-	Doença entérica em animais
F	+	-	-	-	+	-	DTA e por diarreia associada a antibiótico
G	+	-	-	-	-	+	enterite necrótica em aves

Modificada de Rood et al., Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. Anaerobe, 53:5-10, 2018.
<https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>

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 O₂ no alimento

Efeitos de fatores físicos e químicos

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

- esporos não destruídos
- induz germinação
- reduz a quantidade de O₂ no alimento

□ resistentes

- refrigeração
- congelamento

Efeitos de fatores físicos e químicos

- Resistência térmica (célula vegetativa)
 - razoavelmente termo-resistente
 - pouco resistentes
 - refrigeração
 - congelamento

Efeitos de fatores físicos e químicos

□ Resistência térmica (célula vegetativa)

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

□ a_w

- pouco tolerantes à 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* (CPE)
 - Toxinotipo F (A)

Gastrenterite

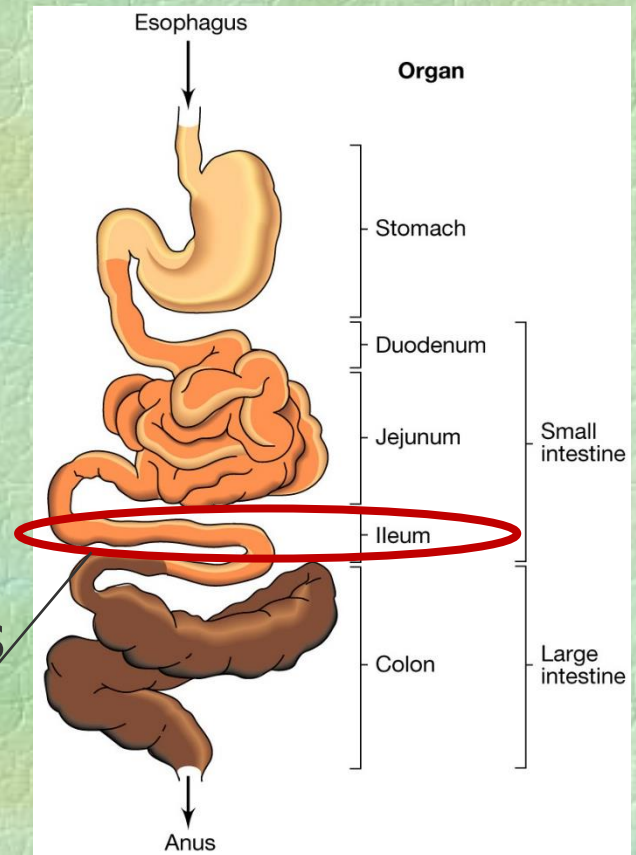
- Agente etiológico
 - cepas toxigênicas de *C. perfringens*
- Dose infectante
 - $>10^6$ - 10^7 UFC/g

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
 - ❑ diarreia
 - ❑ gases
 - ❑ febre, náusea e vômitos - raros
 - ❑ suave e autolimitada



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

Gastrenterite

□ Sintomas

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

□ Duração

- 12 - 24h

Gastrenterite

- Duração

 - < 1 dia

- Não envolve imunidade

Gastrenterite

- Não envolve imunidade

- Fatalidade

 - Baixa $<0,1\%$

 - pode causar problemas em idosos e debilitados

 - Autolimitada

“*C. perfringens* type F isolates also cause ~5- 15% of all non-foodborne human GI disease cases, which include antibiotic-associated diarrhea (AAD) and sporadic diarrhea [225]...often occurs in the nosocomial environment and develops after the intestines of patients (particularly the elderly) receiving antibiotics become colonized by type F strains...” Gohari et al. 2021.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>

Gastrenterite

□ Fatalidade

- baixa
- pode causar problemas em idosos e debilitados

□ Surtos

- relatados quando envolvem grande número de pessoas

Gastrenterite

□ Fatalidade

- baixa
- pode causar problemas em idosos e debilitados

□ Surtos

- 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

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
- >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

□ $\therefore \exists$ 2 populações de *Cp cpe+* mas somente a cromossômica pode causar doenças em humanos

□ *cpe*

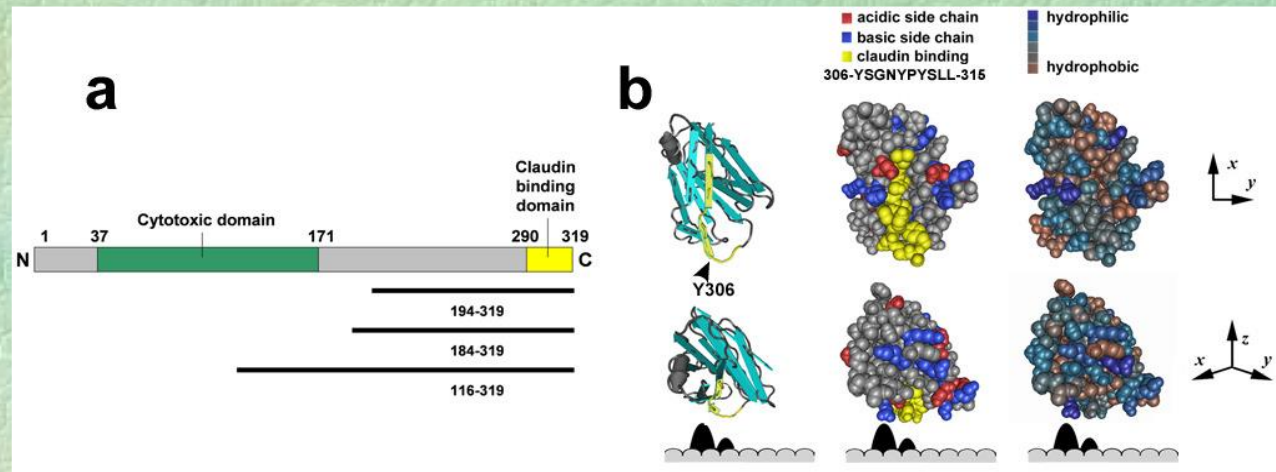
- plasmidial em *C. perfringens* de origem animal
- cromossômico em cepas isoladas de toxi-infecções alimentares

□ $\therefore \exists$ 2 populações de *Cp cpe+* mas somente a cromossômica pode causar doenças em humanos

□ Pesquisar *Cp* ou *Cp cpe+* ????

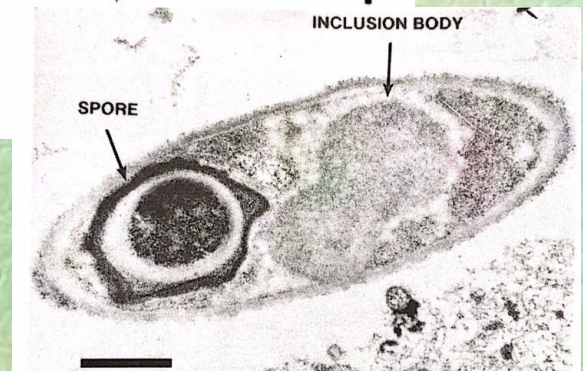
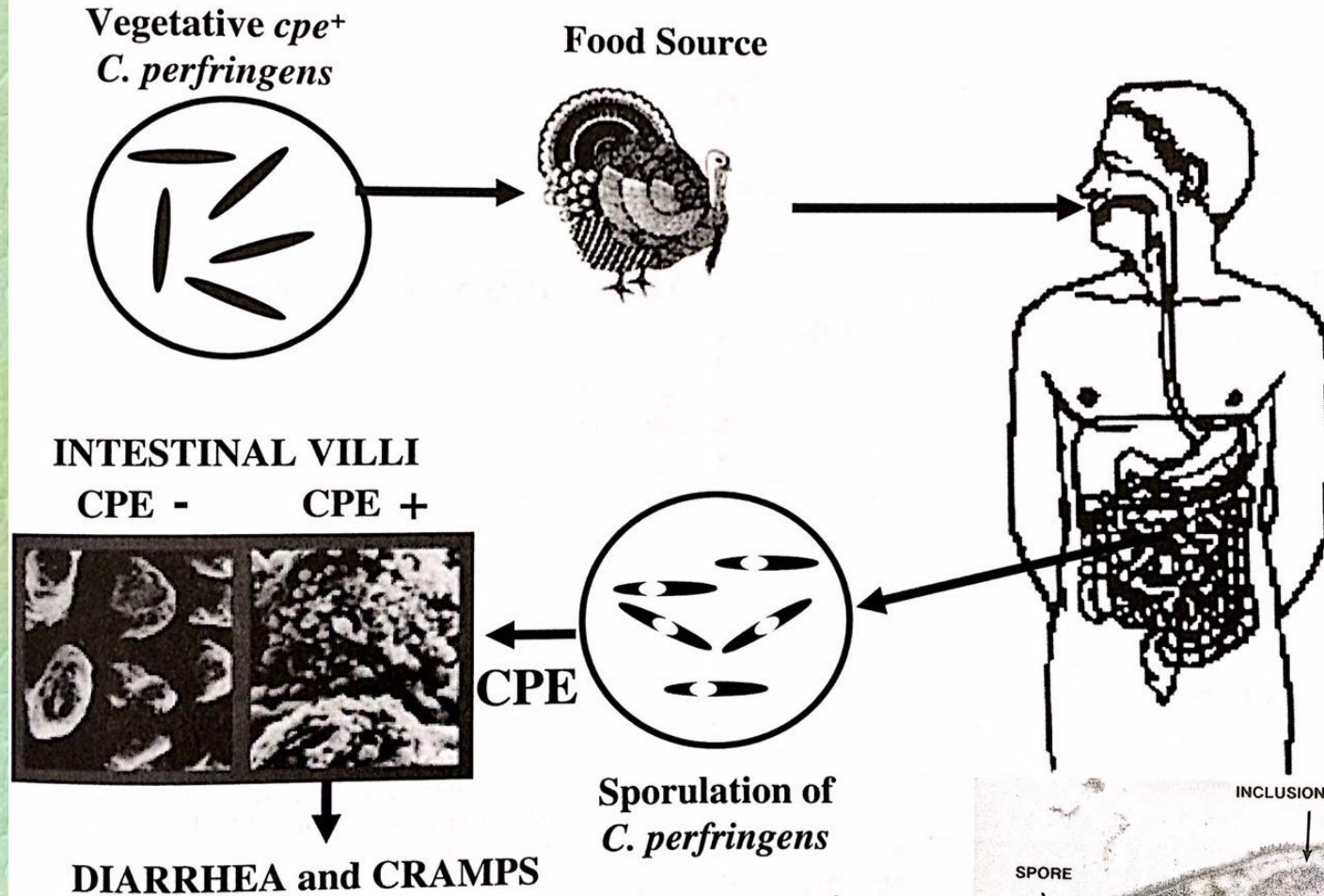
Toxina

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

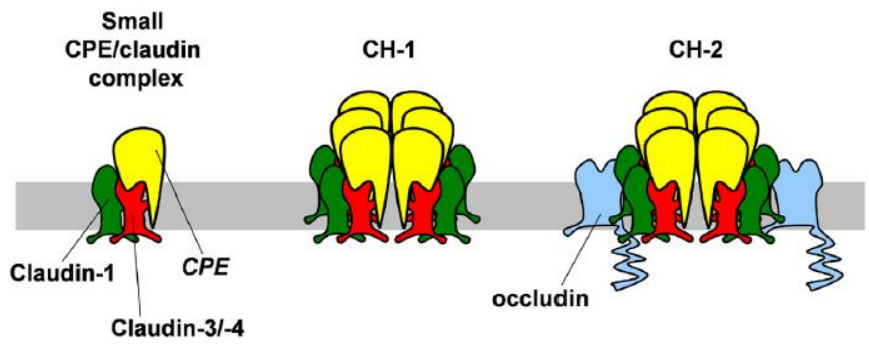
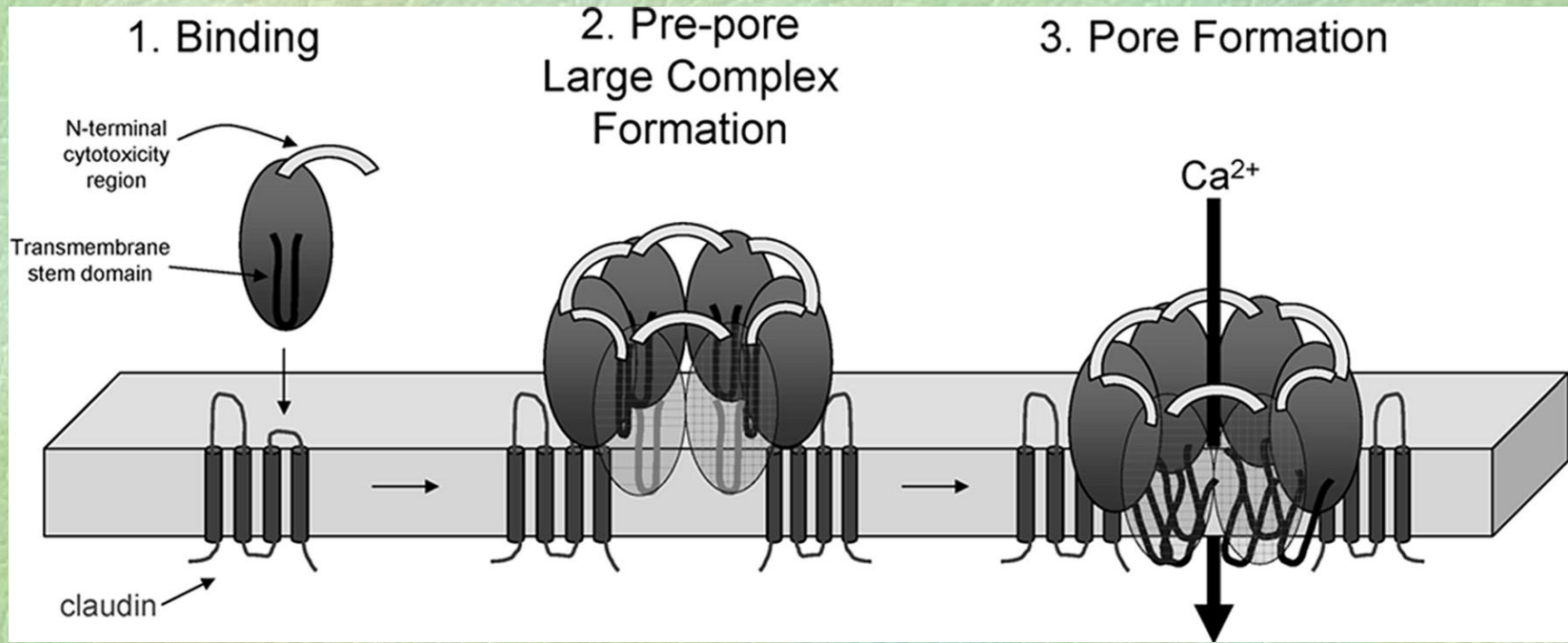


****Pronase - a highly active protease cocktail from *Streptomyces griseus***

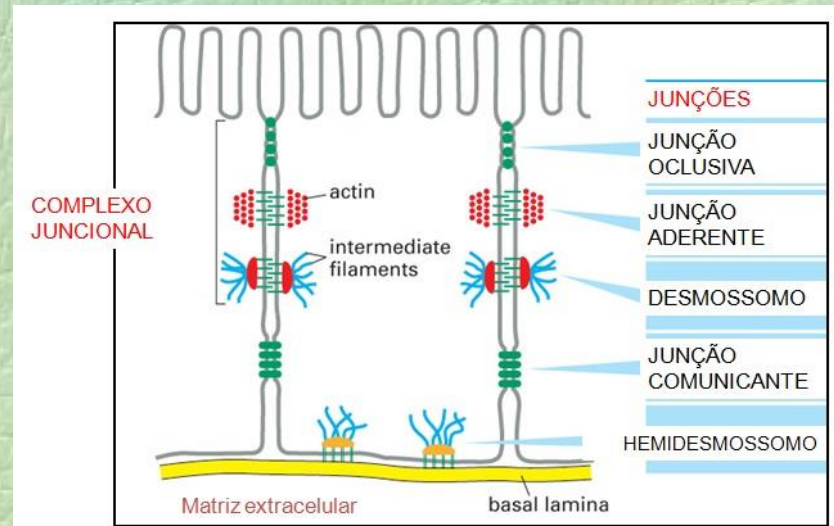
Clostridium perfringens Food Poisoning



Updated model of CPE action



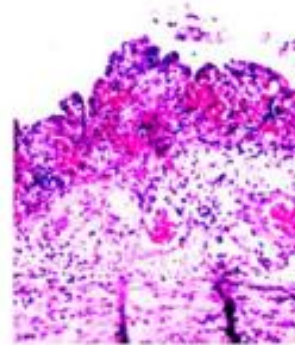
James G. Smedley III et al. Infect. Immun. 2007;75:2381-2390



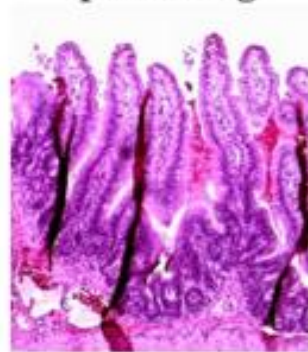
SM101 vegetative



SM101 sporulating



**MRS101 (*cpe* null mutant)
sporulating**



**MRS101 (complemented)
sporulating**

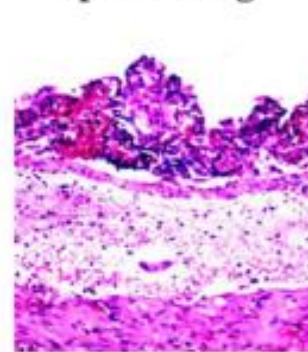


Figure 1. Histologic damage induced by lysates of CPE-positive type A strain SM101, a transformable food poisoning strain derivative. Shown are hematoxylin and eosin-stained tissue sections from rabbit ileal loops treated with concentrated vegetative culture lysates (FTG) or concentrated Duncan-Strong (DS) sporulating culture lysates of wild-type SM101, MRS101 (a *cpe* null mutant of SM101) or a complementing strain where the *cpe* gene has been transformed back into MRS101. Note the complete absence of damage using lysates of SM101 vegetative cultures or DS cultures of the MRS101 *cpe* null mutant. However, extensive necrosis, villus damage, and epithelial desquamation were observed using lysates of the DS culture of wild-type SM101 or the complementing strain. Samples shown are at 250 × magnification. Reproduced with permission from [10].

Toxina - Modo de ação

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

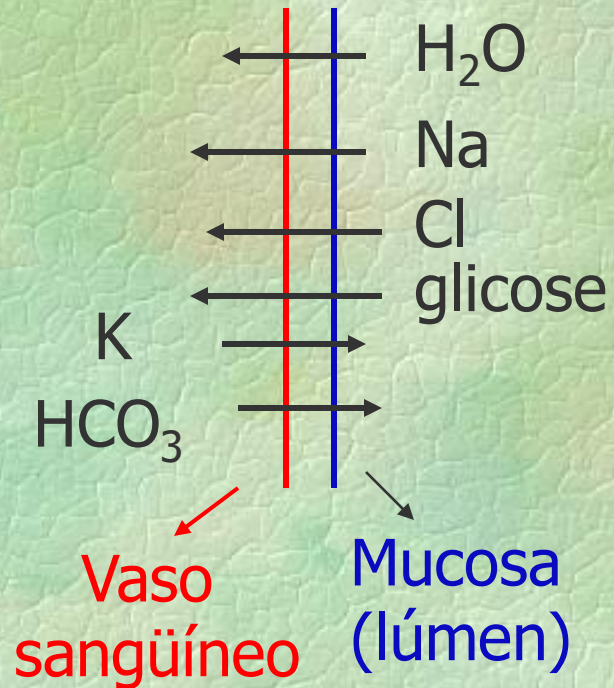


Internalização

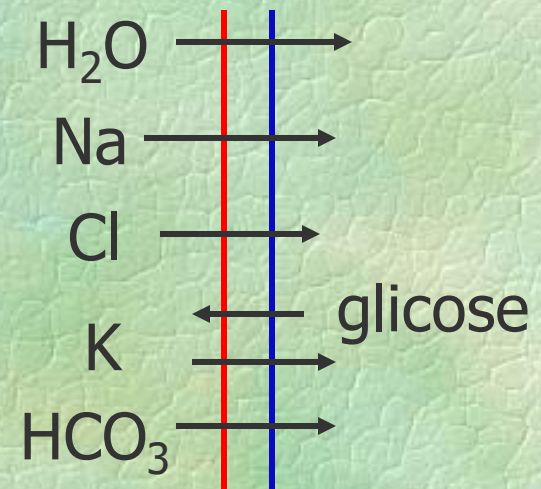


Alteração da permeabilidade
da membrana

Íleo normal



Íleo c/ enterotoxina



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
- Resfriamento rápido de alimentos já cozidos
- Armazenamento a
 - $< 7\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Atividade para ser entregue pelos alunos do diurno (procurar na internet)

□ Surto de *C. perfringens*

- Descreva um surto ocorrido na Inglaterra (G1)
- Descreva um surto ocorrido no Alasca (G2)
- Descreva um surto ocorrido entre prisioneiros (inmates) (G3)

Bibliografia

- Santos Garcia, JEV, Heredia, N, Juneja, VK *Clostridium perfringens*. In: Doyle, MP, Diez-Gonzalez, F., Hill, C. Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. 5th. ed. ASM, Washington, DC. 2019 p.513-540.
doi:10.1128/9781555819972.ch19
- Freedman, JC, Shrestha, A, Bruce A. McClane, BA *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, genetics, and translational applications. Toxins 8, 73, 2016 doi:10.3390/toxins8030073

