

# Micro-organismos patogênicos em alimentos II

- Prof. Uelinton Pinto
- *Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental*
- [uelintonpinto@usp.br](mailto:uelintonpinto@usp.br)

Universidade de São Paulo

Brasil

1

## Clostridium

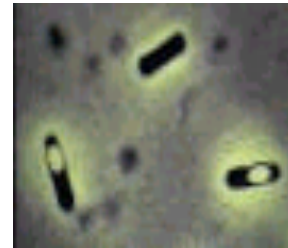
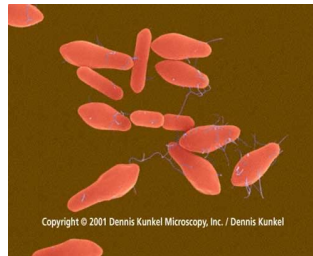
- Mais de 150 espécies
- 2 espécies envolvidas em doenças de origem alimentar
  - **C. botulinum**
  - **C. perfringens**
- Várias espécies causam deterioração em alimentos
  - *C. butyricum*; *C. tyrobutyricum*; *C. sporogenes* etc.

```

graph LR
    A["Bastonetes, Gram-positivos, Anaeróbio estrito, esporulado"] --> B["pH de crescimento: 4,5 - 8,5  
Aw mínimo para crescimento: ~0,94"]
    B --> C["Proteolíticos - hidrolisam proteínas e produzem H2S"]
    C --> D["Não Proteolíticos"]
      
```

2

## Intoxicação Botulínica



Agente causador: *Clostridium botulinum*

3

## *Clostridium botulinum*

Toxinas: Neurotoxinas A, B, C, D, E, F e G

**Toxina botulínica está entre as substâncias mais tóxicas da natureza - 30 ng podem ser suficientes para matar um indivíduo → BIOTERRORISMO ☠**

The toxicity of BoNT/A1 L-PTC in humans was estimated by extrapolation from primate studies to be 1 ug/kg of body weight when taken orally, 10 ng/kg by inhalation, and 1 ng/kg intravenously or intramuscularly [6].

Toxins 2019, 11, 686; <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/12/686>

4

### Efeito de fatores físicos e químicos na multiplicação

- Eh
- Ótimo é baixo
- -350 mv para máximo desenvolvimento
- +30 a +250 mv permitem início da multiplicação

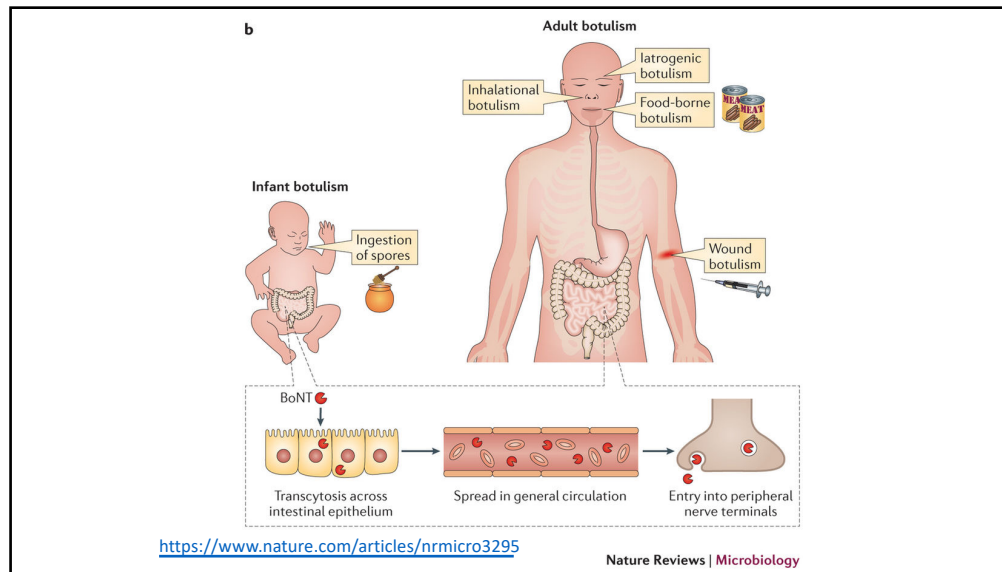
Embalagem a vácuo inibe multiplicação de deteriorantes, facilitando multiplicação de *C. botulinum*

5

## 5 tipos de botulismo humano

- **Botulismo de origem alimentar**
  - Clássico
- **Botulismo infantil**
- Botulismo de feridas (usuários de drogas)
- Botulismo “oculto” (semelhante ao infantil, mas em adultos)
- Botulismo “inadvertido” (botox)

6



7

## Botulismo de origem alimentar

- Período de Incubação: 12 a 36 horas
- Mortalidade: Pode ocorrer entre 3 e 6 dias

Antigamente: 50%  
 Atualmente: 5 – 15% → UTI, tratamento de suporte, tratamento específico com soro antibotulínico

8

## Botulismo de origem alimentar

**Inicialmente provoca** fadiga e fraqueza muscular, tontura, cefaleia, queda de pálpebra, reflexos alternados da pupila a luz e visão dupla, secura na boca, dificuldade na deglutição e de controle da língua. A musculatura da respiração é progressivamente paralisada, podendo provocar morte em 3 a 5 dias (parada respiratória).



doi:10.1128/9781555818463.ch17f1

**Sintomas:** Distúrbio digestivo, náuseas, vômitos, dores de cabeça, fadiga, visão dupla, fotofobia, dificuldade de falar e engolir, paralisia facial progressiva, asfixia.  
**NÃO HÁ FEBRE** e as funções cognitivas não são afetadas.



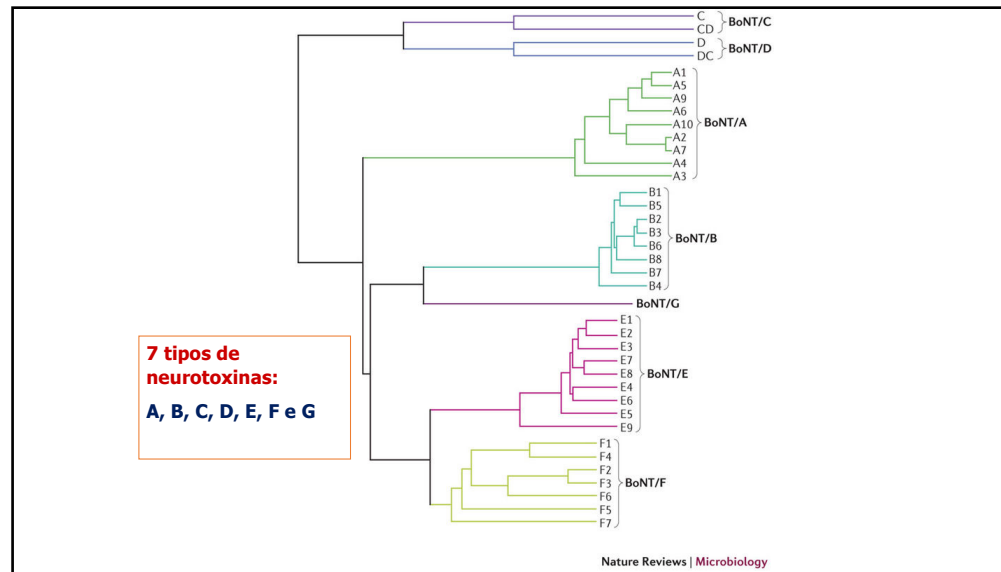
www.meduni-graz.at

9

### • 7 tipos sorológicos da toxina botulínica

- A a G
- A, B, E
  - causam doenças em humanos
  - 98,5% dos casos
- C (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>), D e F
  - Botulismo animal
  - Raramente associados a botulismo humano
- G
  - 1 único caso relatado de ligação com doença
    - Sonnabend et al., 1981
- Outros gêneros de *Clostridium* também podem produzir neurotoxina botulínica.
  - *C. butyricum*: Tipo E (30 casos na Índia em 1998)

10



11

Espécie dividida em 3 grupos baseados em diferenças fisiológicas

Característica	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> <span>Importante aliment envasa</span> <span>Importante alime refrige</span> <span>Importante para aves e outros animais</span> </div>		
	I	II	III
Neurotoxina	A, B, F	B, E, F	C, D
Temp <sub>min</sub>	10	3,3	15
Temp <sub>ótima</sub>	35-40	18-25	40
Resist. Térmica (D <sub>100</sub> )	25'	0,1'	Interm.
[NaCl] inib	10	5	nd
a <sub>w</sub> min	0,94	0,97	nd
Proteolítico	+	-	-

Fonte: Dodds & Austin, 1997

12

## Toxina Botulínica

Termolábil – inativada a 85°C/ 5'

PM 150kDa

L chain – 50kDa; H chain – 100kDa

Vários domínios na cadeia H

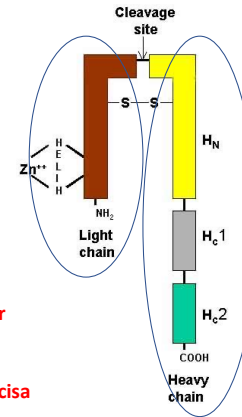
Cada qual com sua função

**Modo de Ação:**

Neurotoxina que bloqueia a liberação de Acetilcolina nos terminais nervosos em junções neuromusculares

Dano permanente, mas o organismo pode se recuperar fazendo novas terminações nervosas.

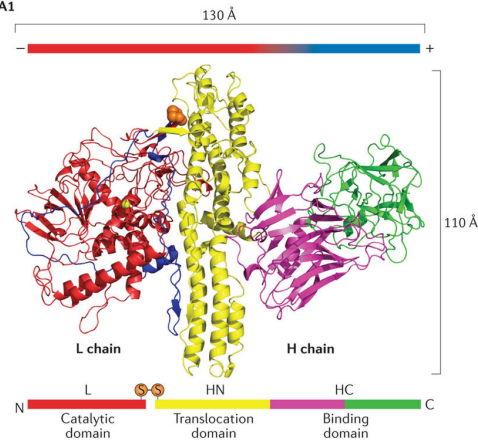
Demora de 1 a 12 meses para se recuperar porque precisa fazer novas terminações nervosas.



13

## Toxina Botulínica

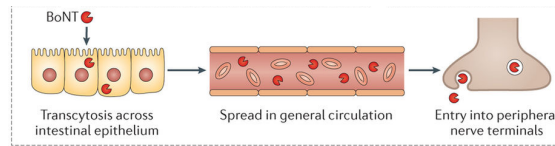
a BoNT/A1



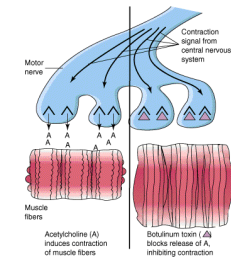
Nature Reviews Microbiology

14

- Mecanismo de patogenicidade



Nature Reviews | Microbiology

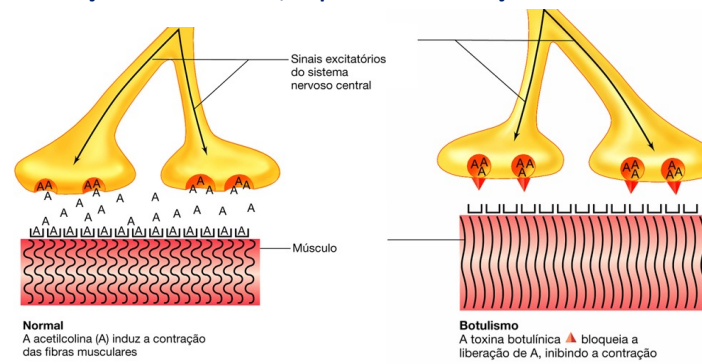


<https://www.nature.com/articles/nrmicro3295>

15

## 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.**



16



## *Clostridium botulinum*

- Alimentos envolvidos:
- Produtos enlatados de baixa acidez
- Conservas caseiras pH>4,5
- Conservas comercialmente preparadas



17

## **Botulismo Infantil**

- ✓ Crianças menores do que 1 ano de idade
- ✓ Ingestão de poucas células ou esporos
- ✓ Produção da toxina no organismo humano (infecção seguida de intoxicação)

Inicialmente ocorre constipação seguida dos sinais neurologicos – choro fraco, hipoatividade, paralisias bilaterais descendentes seguidos de paralisia respiratória.

Dura de 2 a 6 semanas com instalação progressiva dos sinais e sintomas.  
Mel pode ter esporos do *Clostridium* e a toxina não é produzida no alimento e sim no interior do organismo da criança.

18

- Aproximadamente 100 casos são reportados por ano, nos EUA
- 25% intoxicação alimentar
- 72% botulismo infantil
- 3% botulismo de ferida

No Brasil – entre 1999 e 2011 (MS-SVS)

68 casos confirmados

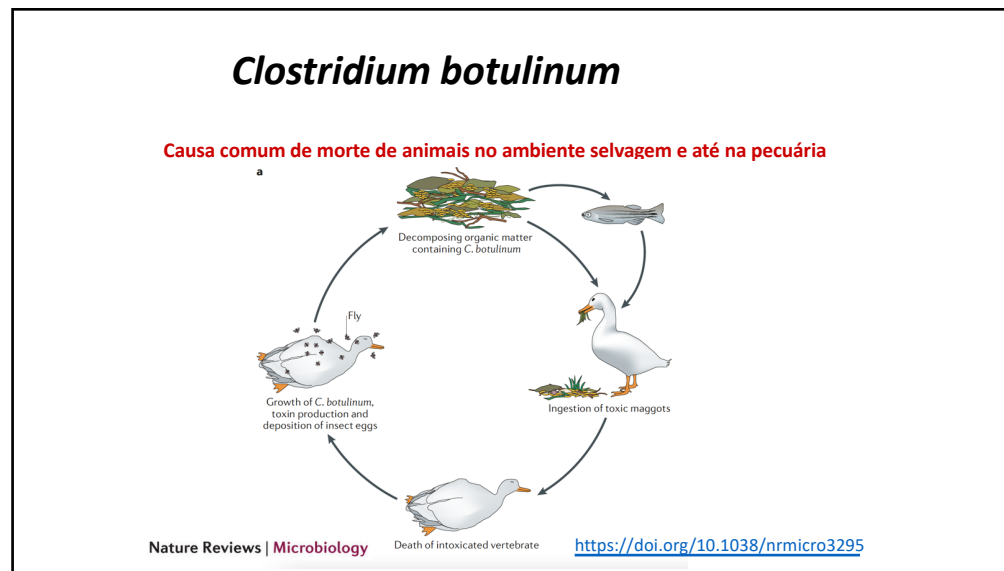
66 intoxicação alimentar (97%)

1 bolulismo infantil

1 botulismo de ferida




19



20

**Botulismo animal**

MENU G1 MATO GROSSO DO SUL

## Cerca de 1,1 mil cabeças de gado morrem por suspeita de botulismo em fazenda de MS

lago suspeita que gado tenha se intoxicado ao consumir ração úmida embolorada.

Por Anderson Vilgas, G1 MS  
08/08/2017 11:08 - Atualizado 08/08/2017 22:16




<https://g1.globo.com/mato-grosso-do-sul/noticia/morte-de-11-mil-cabecas-de-gado-por-suspeita-de-botulismo-causa-prejuizo-de-aproximadamente-r-2-milhoes-em-ms.ghtml>

21

## Tratamento

- Remoção da toxina não absorvida do TGI
- Neutralizar a toxina com soro antbotulínico (mais efetivo nas primeiras 48 h)
  - - CVE/Centro de referência de botulismo
  - Fone: 0800-0555 466
- Internação em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) e rigoroso monitoramento das funções vitais dos pacientes.
- Traqueostomia ou ventilação

22



## Medidas preventivas

- **Destruição do esporo:** Tratamento térmico (esterilização)  $\text{pH} \geq 4,6$ ; Irradiação
- **Impedir a germinação dos esporos ou multiplicação das células**
- →  $\text{pH} < 4,5$ ;  $a_w$  baixa; Refrigeração/congelamento
- Conservantes (nitrito de sódio); defumação
- Melhor forma é a combinação de fatores (teoria das barreiras)
- **Inativação da toxina:** fervura 15 min
- → não dar mel a crianças menores de um ano e pacientes em tratamento prolongado com antibióticos ou drogas imunossupressoras!

---

23

## *Clostridium botulinum*

---

- Atividade em grupo → 15 minutos
- Grupo 1 – Apresente um caso ou surto de botulismo em “baby food”
- Grupo 2 – Apresente um surto de botulismo por suco de cenoura (2006)
- Grupo 3 – Apresente um surto de botulismo por hot dog chili sauce (2007)
- Grupo 4 – Apresente um surto de botulismo por uma conserva caseira ou comercialmente preparada em restaurante

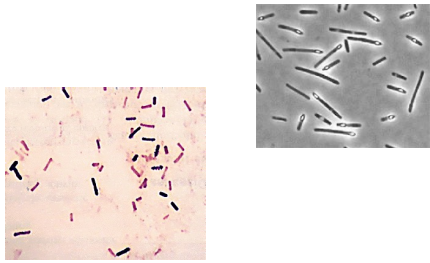
24

## Atividade para discussão

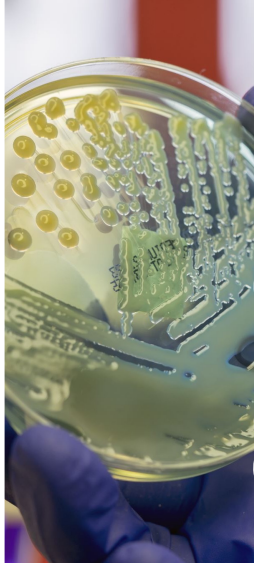
1. Um produto a base de azeite, vinagre e alho provocou botulismo. Explique o que pode ter acontecido para haver crescimento, considerando que azeite tem baixa aw para permitir crescimento da bactéria e o vinagre diminui o pH para abaixo de 4,6.
2. Um produto refrigerado foi causa de botulismo. Sabendo que refrigeração controla a multiplicação desta bactéria, o que pode ter acontecido? Controlar botulismo apenas por refrigeração seria uma boa estratégia? Por que não?
3. Um produto que não "parece" fornecer condições de anaerobiose suficientes, ou seja, que foi embalado em um filme plástico com certa permeabilidade, foi implicado em um surto de botulismo. O que pode ter acontecido?

25

## *Clostridium perfringens*



26



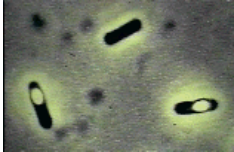
## *C. perfringens*

- 2 tipos de doença via alimentos
  - **toxi-infecção por *C. perfringens* tipo F** (reconhecido desde 1940)
  - enterite necrótica
- 2 principais toxinas importantes ativas no TGI
  - enterotoxina do *C. perfringens* – **CPE** (***Clostridium perfringens* enterotoxin**)
  - $\beta$  toxina
    - Enterite necrótica

27

## Toxi-infecção por *Clostridium perfringens*

- Muito comum nos EUA
- Surtos são grandes, normalmente refeições institucionais
- ~ 1 milhão casos por ano nos EUA/ perdas economicas ~\$400 milhões
- 10% dos casos com agentes identificados
- Perde apenas para *Salmonella* e norovirus



28

## *Clostridium perfringens*

**Sintomas da gastroenterite:** Diarréia, Dor abdominal severa, gases.

**Vômitos não são comuns** (< 15 % dos casos)

**Febre mais rara**

**Mortalidade: Baixa < 0,1%**

**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>

29

## *C. perfringens*

### Tempo de geração

- 10-12 min (em condições ótimas)

### Temperatura

- 20 - 50 °C (ótima 43 - 45 °C)
- < 20 °C fase lag aumentada

### Esporos altamente resistentes a

- radiação
- dessecação
- calor

### Enterotoxina produzida de forma concomitante à do esporo

30

# *C. perfringens*

**Esporos altamente resistentes a**

radiação  
dessecação  
calor

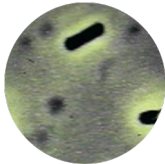
**Anaeróbio**

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

31

## *Clostridium perfringens*

- Principais fontes
  - Alimentos (carnes ~50% de positividade)
  - trato intestinal de humanos e trato intestinal de animais
  - Amplamente distribuído na natureza (solo, poeira) ( $10^3$  -  $10^5$  UFC/g)
  - Menos que 5% dos isolados carregam o gene *cpe*
  - 70% dos isolados envolvidos em surtos (estirpe F) carregam o gene *cpe* no cromossomo



Gohari et al. 2021. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>

32



## Gastroenterite

- Agente etiológico
  - cepas enterotoxigênicas de *C. perfringens*
- Dose infectante
  - $>10^6$  UFC/g cel. Vegs.
- Período de incubação
  - 6 - 24h (média 8 - 12h)
  - Atuação no jejuno e ileo
- Duração
- 12 - 24h (em idosos ou enfermos pode durar até 2 semanas)
- Não envolve imunidade

**Major bacteria present**

**Organ**

Esophagus

Stomach

Duodenum

Jejunum

Ileum

Small intestine

Colon

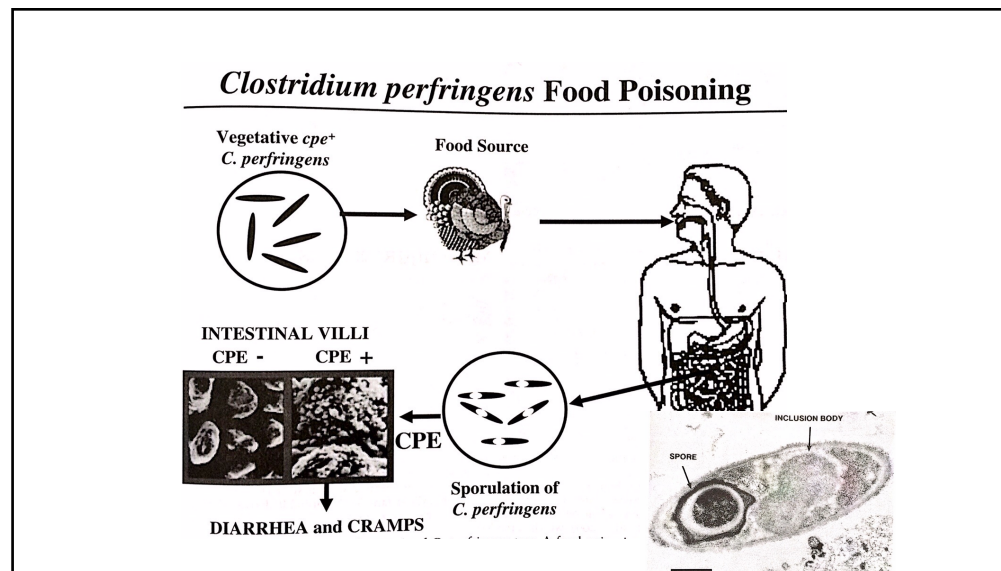
Large intestine

Anus

Enterococci  
Lactobacilli

Enterobacteria  
Enterococcus faecalis  
Bacteroides  
Bifidobacterium  
Eubacterium  
Peptococcus  
Peptostreptococcus  
Ruminococcus  
Clostridia  
Lactobacilli  
Streptococcus  
Staphylococcus

33



34

## Gastroenterite

- Fatalidade
  - baixa
  - pode causar problemas em idosos e debilitados
- Surtos
  - somente relatados quando envolvem grande número de pessoas
  - usualmente ligados a refeições coletivas
- Alimentos envolvidos
  - pratos a base de carnes, carnes cozidas, tortas de carne, molhos com carne, peru ou frango

35

## Principais causas de surtos

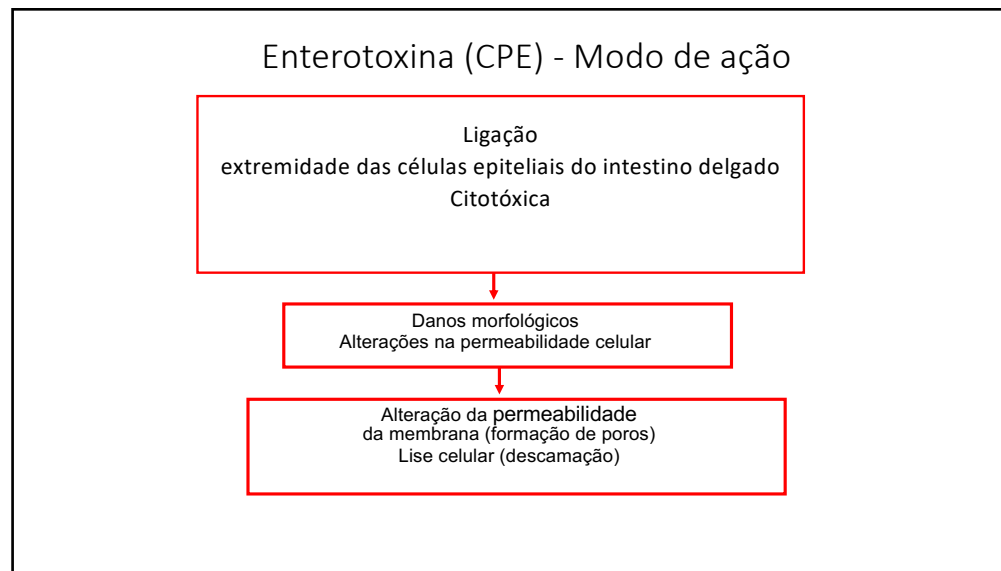
- Pratos a base de carne com:
  - Abuso de temperatura
    - **armazenamento**
    - **manutenção a quente (inadequada)**
  - Cocção inadequada
  - Preparo de grandes porções
  - Equipamentos contaminados

36

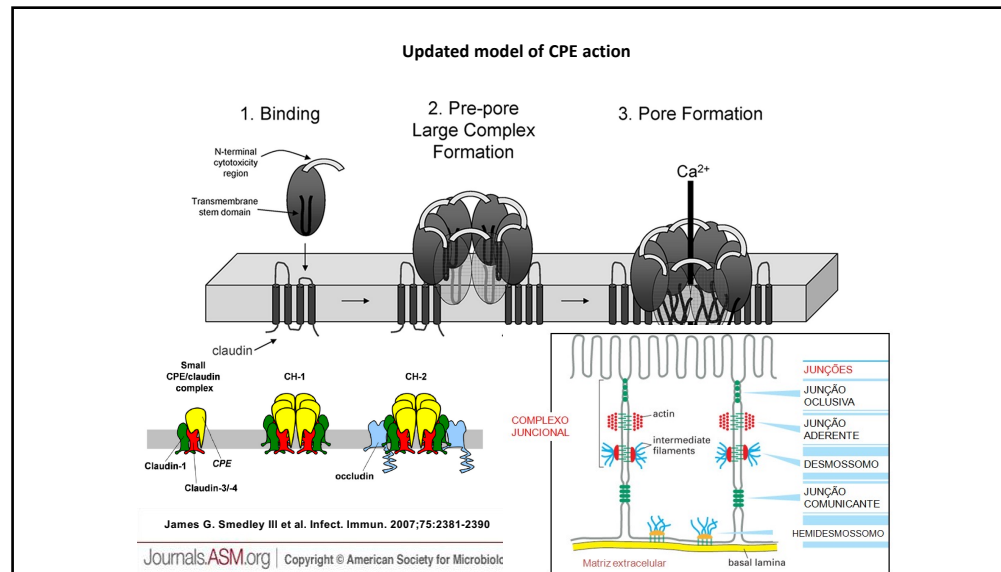
## Toxina CPE

- Produção codificada pelo gene *cpe*
  - Cromossomal (maioria dos surtos)
  - Plasmidial pode acontecer
  - Apenas ~5% dos isolados ambientais possuem o gene
  - Expressão correlacionada com esporulação
  - Pode ser produzida em alimentos (mas é raro)
  - Termolábil (inativada em temperaturas acima de 60°C)

37



38



39

**Table 1**  
 The 2018 *C. perfringens* toxin-based typing scheme.<sup>a</sup>

Toxinotype	$\alpha$ -toxin ( <i>plc</i> or <i>cpa</i> )	$\beta$ -toxin ( <i>cpb</i> )	$\epsilon$ -toxin ( <i>etx</i> )	$\iota$ -toxin ( <i>iap</i> and <i>ibp</i> )	CPE ( <i>cpe</i> )	NetB ( <i>netB</i> )
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	±	-
D	+	-	+	-	±	-
E	+	-	-	+	±	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

<sup>a</sup> The names of toxin structural genes are shown in parentheses.

• Rood et al. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>

40

**Table 3.** *C. perfringens* toxinotype: disease associations.

Toxinotype	Diseases and species affected
A	Gas gangrene of humans and several animals; possible involvement in enterotoxemia and GI disease of ruminants, horses and pig; hemorrhagic gastroenteritis in dogs and horses
B	Lamb dysentery
C	Hemorrhagic and necrotizing enteritis of several neonatal animals; struck; enteritis necroticans (pig-bel, Darmbrand) in humans
D	Enterotoxemia in sheep, goats and cattle; enterocolitis in goats
E	Possible involvement in gastroenteritis of cattle and rabbits
F	Human food poisoning, antibiotic associated diarrhea and sporadic diarrhea
G	Necrotic enteritis of poultry

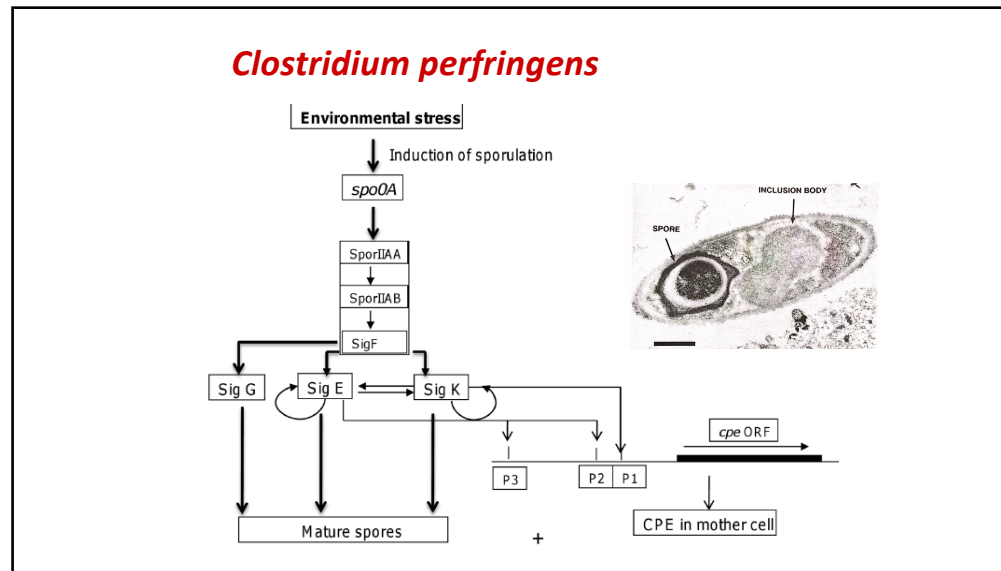
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>

41

## *Clostridium perfringens*

- - **MECANISMO DE PATOGENICIDADE (Resumo)**
- Enterotoxina forma-se durante processo de esporulação
- Toxinfecção alimentar: ingestão de alimentos contendo grandes quantidades de células de *C. perfringens* → esporulam no intestino delgado, liberando enterotoxina

42



43

## Medidas preventivas

- → Treinamento dos manipuladores de alimentos/educação das donas de casa
- Alertar sobre:
  - Riscos de preparo de alimentos em larga escala
  - Riscos de preparo com antecedência
  - Temperaturas para o reaquecimento ( $T^{\circ}\text{C}$  interna de pelo menos  $70^{\circ}\text{C}$ , preferivelmente  $> 74^{\circ}\text{C}$ )
  - Riscos de permanência do alimento em temperatura ambiente e do resfriamento lento (estocagem ideal abaixo de  $4^{\circ}\text{C}$  ou acima de  $60^{\circ}\text{C}$ ).
  - Necessidade de refrigeração imediata das sobras.
  - Necessidade de resfriamento rápido.

---

44

44

## *Clostridium perfringens*



Atividade em grupo → 10 minutos



Encontre um surto por *C. perfringens* e faça uma síntese do mesmo