

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PRINCIPAIS BACTÉRIAS PRESENTES EM DOENÇAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS (DTAs)**

Autor: Carlos Eduardo de Toledo Pires

PORTO ALEGRE

2011/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PRINCIPAIS BACTÉRIAS PRESENTES EM DOENÇAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS (DTAs)**

Autor: Carlos Eduardo de Toledo Pires

**Trabalho apresentado como
requisito parcial para graduação
em Medicina Veterinária**

Orientador: Guiomar Pedro Bergmann

PORTO ALEGRE

2011/2

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos ocorrem quando uma pessoa contrai uma enfermidade devido à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis. Essa condição é frequentemente denominada como toxinfecção alimentar. Muitos casos de enfermidades causadas por alimentos não são notificados, pois seus sintomas são geralmente parecidos com gripes. Os sintomas mais comuns de doenças de origem alimentar incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre.

As toxinfecções alimentares de origem microbiana têm sido reconhecidas como o problema de saúde pública mais abrangente no mundo atual, causando um impacto econômico negativo, acarretando grandes perdas econômicas para as indústrias, para o turismo e para a sociedade. Os perigos, quando de natureza microbiana, decorrem não apenas de enfermidades transmissíveis ao homem pela ingestão de alimentos infectados (ou por simples contato com as fontes de contágio), mas também devem-se às toxinfecções alimentares.

A atenção na área de segurança alimentar sempre se faz necessária devido ao perigo causado pelas doenças transmitidas por alimentos em frente à saúde pública. Melhorias nos métodos de processamento de alimento e a conscientização a respeito da saúde alimentar de todos os envolvidos na cadeia de produção de alimentos certamente reduziriam a incidência das doenças de origem alimentar.

Práticas inadequadas que ocorrem durante o processamento permitem as contaminações pela sobrevivência e multiplicação de microrganismos nos alimentos, em destaque as bactérias, onde a implantação de Boas Práticas de Fabricação se faz obrigatória para promover a segurança alimentar aos consumidores, de modo eficaz e eficiente no controle das DTAs.

Devido à conscientização do público em relação às doenças transmitidas por alimentos, é importante que todas as companhias alimentícias mantenham altos padrões de higiene e garantam a segurança de seus produtos.

Palavras-chave: Bactérias; Doenças transmitidas por alimentos; Boas práticas de fabricação; Patógenos e Microrganismos.

ABSTRACT

Foodborne diseases occur when a person incurs an illness due to ingestion of food contaminated with microorganisms or undesirable toxins. This condition is often termed as food poisoning. Many cases of illness caused by foods are not notified, because its symptoms are generally similar to flu. The most common symptoms of foodborne illness include stomach pain, nausea, vomiting, diarrhea and fever.

The food poisoning of microbial origin has been recognised as the most comprehensive public health problem in today's world, causing a negative economic impact, causing major economic losses for the industries, for tourism and society. The dangers, when microbial nature, arising not only from diseases transmitted to humans by infected food intake (or by simple contact with sources of contagion), but should also apply to food poisoning.

Attention in the area of food security always is required due to the danger caused by foodborne diseases in front of the public health. Improvements in methods of food processing and awareness regarding the health food of all those involved in the food production chain certainly would reduce the incidence of food-borne diseases.

Inadequate practices that occur while processing allow the defilements by survival and multiplication of microorganisms in food featured, bacteria, where the deployment of Good Manufacturing Practices If makes mandatory to promote food safety for consumers, effectively and efficiently in the control of foodborne diseases.

Due to public awareness in relation to foodborne diseases It is important that all food companies maintain high standards of hygiene and ensuring the safety of their products.

Keywords: Bacteria; Foodborne diseases; Good Manufacturing Practices; Pathogens and Microorganisms.

LISTA DE ABREVIATURAS

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

a_a – Atividade de água

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ca^{++} - Íon cálcio

CDC – Centro de Controle de Zoonoses

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNase - Desoxirribonuclease

EaggEC – *Escherichia coli* Enteroagregativas

EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva

EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica

EUA – Estados Unidos da América

FEEC – *Escherichia coli* Enteropatopatógena facultativa

GDL – Gluconato-delta-lactona

H – Hidrogênio

KNO₃ – Nitrato de potássio

LT – Termolábil

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

n° - Número

NaCl – Cloreto de sódio

NaNO₂ – Nitrito de sódio

NMEC – *Escherichia coli* Neonatalmeningite

NMP – Número mais provável

O₂ – Oxigênio

OIE – Organização Internacional de Epizootias

pH – Potencial de Hidrogênio

ppm – Parte por milhão

REDOX – Oxi-redução

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RNA – Ácido Ribonucleico

S-S – Dissulfeto

SCP – *Staphylococcus* Coagulase Positiva

SPS – Sulfeto de polimixina-sulfadiazina

TNase – Termonuclease

TSN – Ágar triptona-sulfodiazina-neomicina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UPEC – *Escherichia coli* Uropatogênica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MICROORGANISMOS CAUSADORES DE DOENÇAS ALIMENTARES	12
3	INFECCÕES E INTOXICAÇÕES ALIMENTARES	13
4	TOXINFECÇÕES ALIMENTARES	14
5	SALMONELLA	15
5.1	Curso da Infecção	17
5.2	Dose Infectante	18
5.3	Difusão e Fontes de Infecção	18
5.4	Alimentos Implicados	19
5.5	Resistência	21
5.6	Ocorrência no Brasil	22
5.7	Prevenção	23
6	SHIGELLA	26
6.1	Curso da Infecção	26
6.2	Dose Infectante e Modo de Ação	27
6.3	Transmissão e Alimentos Implicados	27
6.4	Resistência	28
6.5	Prevenção	28
7	ESCHERICHIA COLI	29
7.1	Modo de Ação	31
7.2	Curso de Infecção	31
7.3	Alimentos Implicados	31
7.4	Como Indicador de Higiene	32
7.5	Prevenção	32
8	VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS	34
8.1	Curso de Infecção e Modo de Ação	34
8.2	Dose Infectante	35
8.3	Difusão	35
8.4	Fontes de Infecção e Alimentos Implicados	36
8.5	Resistência	36
8.6	Ocorrência no Brasil	37
8.7	Prevenção	38

9	YERSINIA ENTEROCOLITICA	39
9.1	Difusão	39
9.2	Modo de Ação e Curso de Infecção	40
9.3	Alimentos Implicados	41
9.4	Resistência	42
9.5	Ocorrência no Brasil	43
9.6	Prevenção	44
10	STREPTOCOCCUS	45
10.1	Microrganismos Implicados	45
10.2	Curso da Intoxicação e Sintomas	45
11	CAMPYLOBACTER	47
11.1	Alimentos Implicados	47
12	CLOSTRIDIUM BOTULINUM	49
12.1	Botulismo	52
12.2	Botulismo Infantil	54
12.3	Curso da Enfermidade	54
12.4	Ocorrência no Brasil	56
12.5	Distribuição	57
12.6	Alimentos Implicados	58
12.7	Resistência	61
12.8	Prevenção	65
13	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	69
13.1	Dose Infectante	72
13.2	Difusão	73
13.3	Alimentos Implicados	74
13.4	Resistência	82
13.5	Prevenção	84
14	CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	87
14.1	Microrganismo	87
14.2	Curso da Infecção e Modo de Ação	89
14.3	Difusão	90
14.4	Fontes de Infecção	91
14.5	Alimentos Implicados	92

14.6 Ocorrência no Brasil.....	92
14.7 Prevenção	94
15 BACILLUS CEREUS	96
15.1 Modo de Ação e Sintomas	96
15.2 Fontes de Infecção	97
15.3 Alimentos Implicados	97
15.4 Prevenção	98
16 LISTERIA MONOCYTOGENES	99
16.1 Transmissão	99
16.2 Curso de Infecção	100
16.3 Microrganismo	101
16.4 Isolamento do Agente	101
16.5 Contaminação Cruzada e Análise de Risco	102
16.6 Análise no Brasil	103
16.7 Prevenção	103
17 CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

Doenças microbianas de origem alimentar ou toxinfecções alimentares constituem um grupo de doenças, no qual o alimento contaminado é o mais importante veículo do agente patogênico (PAIVA *et al.*, 2000). As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis. Essa condição é, freqüentemente, denominada como toxinfecção alimentar. Muitos casos de enfermidade causada por alimentos não são notificados, pois seus sintomas são geralmente parecidos com gripes. Os sintomas mais comuns de doenças de origem alimentar incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. É sabido que apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos é notificado aos órgãos de inspeção de alimento, de controle e às agências de saúde. Isso se deve, em parte, ao fato de que muitos patógenos presentes em alimentos, causam sintomas brandos, e a vítima não busca auxílio médico. Portanto, o número de casos notificados pode ser definido como a ponta do *iceberg*, tendo em vista o número real de toxinfecções causadas por alimentos.

A quantidade de produtos disponíveis no mercado oferece ao consumidor a oportunidade de ampla escolha. Entretanto, apesar do progresso na medicina, na ciência e na tecnologia de produção de alimentos, as enfermidades causadas por patógenos alimentares continuam apresentando problemas significativos para a saúde e economia.

Segundo Altekruise *et al.* (1997) as toxinfecções alimentares de origem microbiana tem sido reconhecidas como o problema de saúde pública mais abrangente no mundo atual, causando um impacto econômico negativo, acarretando grandes perdas econômicas para as indústrias, para o turismo e para a sociedade.

Em 1990, uma média de 120 casos de enfermidades de origem alimentar foi notificada em um grupo de 100 mil pessoas, em onze países europeus. Mais recentemente, estimativas baseadas em um estudo sentinela indicaram que em alguns países europeus há, no mínimo, 30 mil casos de gastroenterites agudas (muitas delas de origem alimentar) para um grupo de 100 mil pessoas, anualmente (PAIVA *et al.*, 2000).

Os perigos, quando de natureza microbiana, decorrem não apenas de enfermidades transmissíveis ao homem pela ingestão de alimentos infectados (ou por simples contato com as fontes de contágio), mas também devem-se às toxinfecções alimentares.

Dentre os principais causadores de doenças transmitidas por alimentos, estão em destaque as bactérias, devidos ao seu envolvimento na maioria dos surtos e sua importância na saúde pública, como veremos no decorrer do trabalho.

2 MICRORGANISMOS CAUSADORES DE DOENÇAS ALIMENTARES

Os organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos são normalmente divididos em dois grupos: infecciosos (como *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* patogênicas) e intoxicantes (como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*).

O primeiro grupo compreende os microrganismos que se multiplicam no trato intestinal humano, enquanto o segundo é formado por aqueles microrganismos que produzem toxinas, tanto nos alimentos quanto durante sua passagem pelo trato intestinal. Essa divisão é bastante útil, pois auxilia no reconhecimento das rotas da enfermidade alimentar. Os microrganismos vegetativos são destruídos por tratamento térmico, porém esporos bacterianos podem sobreviver e, então, germinar em alimentos que são mantidos sob frio ou calor adequados.

3 INFECÇÕES E INTOXICAÇÕES ALIMENTARES

A Portaria 01/87, da DINAL/M. S. (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1987), conceitua os produtos potencialmente capazes de causar toxinfecções alimentares da forma: “São os que apresentam *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e seus indicadores (clostrídios sulfito-redutores a 46°C), em número superior a dez vezes os limites estabelecidos nos padrões específicos. Incluem-se, ainda, os microrganismos infectantes, tais como: *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* spp., *Campylobacter jejuni* e outros reconhecidos e caracterizados como agentes de infecções alimentares”.

Frazier (1993) refere-se ao emprego do termo “intoxicação alimentar” para caracterizar as enfermidades produzidas por microrganismos e que, usado em sentido mais amplo, inclui tanto enfermidades causadas pela ingestão de toxinas elaboradas pelos microrganismos, como aquelas devidas à infecção do hospedeiro através do trato intestinal. Utiliza-se o termo “enfermidade alimentar” aplicado a qualquer doença causada pela ingestão de alimento onde se encontra a toxina. Distingue ainda a expressão “infecção alimentar” como aquela determinada pela invasão, multiplicação e alterações tissulares do hospedeiro, provocadas por microrganismos patogênicos levados pelos alimentos.

Siniell (1981), referindo-se as alterações microbiológicas transmissíveis ao homem pelos alimentos, define-se como procedentes de contaminações primárias ou secundárias, podendo provocar no homem enfermidades infecciosas ou gerar intoxicações por meio de substâncias tóxicas. Nos casos que aparecem sintomas de intoxicação combinados com os de infecção, denomina-os de “toxinfecção”. As causas microbiológicas que conduzem a problemas alimentares são muito maiores do que aquelas ensejadas por agentes químicos, como o comprovam dados estatísticos de países como os Estados Unidos da América, que, na década de 1980, ao apontarem os surtos de transtornos alimentares e enfermidades dessa origem, demonstravam predominância das causas microbianas superiores a 70% em relação às parasitárias e às de natureza química. Entre os distúrbios de origem bacteriana, pela ordem, ocorreram surtos provocados por *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Shigella*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*.

4 TOXINFECÇÕES ALIMENTARES

Nas toxinfecções alimentares, por alguns chamadas intoxicações do tipo infecção, desenvolve-se um quadro típico de infecção provocado pela ingestão de carne ou outro alimento contaminado por bactérias patogênicas, que produzirão as toxinas no próprio organismo do hospedeiro.

São tidas como capazes de provocar toxinfecções alimentares, diversas espécies dos gêneros *Salmonella e Shigella*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica e Streptococcus*.

Estas enfermidades, causadas principalmente por representantes da família *Enterobacteriaceae*, habituais nos intestinos do homem e animais, estão sempre relacionadas com uma contaminação de origem fecal. Caracterizam-se, sobretudo, por fenômenos gastrintestinais.

Os patógenos mais freqüentes transmitidos pela água são aqueles que causam infecção no trato gastrointestinal. Os principais agentes dessas infecções são encontrados na família *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*) e nos gêneros *Campylobacter*, *Vibrio e Clostridium*, além dos vírus responsáveis pelas hepatites. (TRABULSI *et al.*, 2004).

5 SALMONELLA

A importância da salmonelose para o homem e os animais se destaca no quadro mesmo das toxinfecções alimentares, em seu confronto com as intoxicações por botulismo ou por estafilococos.

A preocupação com a ubiquidade da *Salmonella* e com os efeitos decorrentes de sua propagação nos alimentos tem extensão universal. As tentativas visando ao seu controle tem ocupado a atenção dos órgãos responsáveis pela saúde pública e dos higienistas, com ponderáveis repercussões de ordem econômica, resultante de medidas acauteladoras impostas à indústria e ao comércio local e internacional.

Segundo Sinell (1981), dentro do gênero *Salmonella*, são hoje distinguidos sorologicamente e, em parte, também mediante provas bioquímicas, cerca de 2.000 sorotipos diferentes, que muitos consideram espécies próprias.

A incidência de salmoneloses tem aumentado significativamente durante as duas últimas décadas, em todo o mundo. Geralmente, os humanos são infectados por *Salmonella* sp através de água e alimentos contaminados, principalmente de origem animal, podendo ocorrer também a transmissão direta, via contato com animais contaminados, sendo as aves e os bovinos indicados como as principais origens dessa bactéria (KWANG *et al*, 1996).

Rodrigues *et al.* (1990) atribuíram esse aumento ao consumo de ovos e subprodutos contaminados por *Salmonella enteritidis*. Entretanto, a presença de *Salmonella* sp em carcaça de frangos também não pode ser ignorada (RAMPLING *et al.*, 1989; GIESSEN *et al.*, 1992).

Este fato justifica plenamente a apreensão generalizada, uma vez que cada sorotipo deste gênero é considerado, como patógeno. A toxinfecção alimentar produzida pela *Salmonella* pode ter como causa uma série desses tipos sorológicos. Os animais e produtos de origem animal são os maiores reservatórios de *Salmonella*. A tecnologia atual nas fábricas não garante que os produtos estejam livres de *Salmonella*, se forem oriundos de animais portadores. Fala-se na incidência de 79% em galinhas congeladas no Reino Unido e de 15-48% em aves frescas no Canadá.

Genigeorgis (1986) mostra que a salmonelose permanece como uma das três doenças de origem alimentar mais comuns nos EUA. Está sendo apenas realista alguém que admite que qualquer carne (especialmente a de ave) que chega a uma cozinha doméstica ou institucional ou mesmo a uma planta processadora esteja contaminada com salmonela e deva ser manuseada como tal.

Bryan (1976) mostra que os problemas associados a carnes frescas cozida em cozinha doméstica ou institucional se originam principalmente do resfriamento impróprio de alimentos cozidos, do reaquecimento inadequado, da demora no servir, da contaminação cruzada entre os alimentos crus e cozidos, da ineficiência na limpeza do equipamento, da manutenção a quente inapropriada e em grau limitado, bem como de pessoas infectadas.

Segundo Johnston (1983), as impropriedades ao nível de fábrica, incluem subaquecimento, contaminação cruzada, resfriamento impróprio e cura inadequada.

Como o resultado de surtos e de resultados de pesquisas, o departamento de agricultura dos Estados Unidos publicou um processo e exigências para os processadores minimizarem o risco com a *Salmonella* nas carnes cozidas comercialmente processadas, no *roast beef e corned beef*. Recomendam-se dezesseis combinações de tempo-temperatura interna para o cozimento desses produtos. Elas incluem 62,8°C instantaneamente ou 60°C por 12 minutos ou 54,4°C por 12 minutos, além de outras combinações capazes de provocar sete reduções decimais de uma população de *Salmonella* nos produtos. O cozimento baseado nessas combinações não controlará a contaminação pós-processamento, efetuada durante a embalagem, reembalagem ou outro tipo de manuseio dos produtos.

As exigências do departamento para processadores surtiram os efeitos desejados, uma vez que não se relatou, desde 1983, nenhum outro surto ou detecção da *Salmonella* em *roast beef e corned beef*.

Johnston (1983) relatou a ocorrência de um surto de salmonelose na Califórnia em 1982, devido ao consumo de um produto chamado “basturma”, um tipo de carne armênia dessecada. Este surto levantou a questão da segurança na produção específica de cada país e nas fábricas pequenas, com repercussão sobre a política de distribuição para outra região.

A sobrevivência de *Salmonella* neste produto e o desenvolvimento de métodos alternativos para assegurar a destruição do patógeno foram avaliados por Genigeorgis (1986), que demonstraram o potencial de sobrevivência da *Salmonella* em produtos cárneos curados, cujo processo não inclui fermentação ou aquecimento terminal. A probabilidade de crescimento de uma *Salmonella* sobrevivente ao processo ou de recontaminação de carnes curadas perecíveis após processamento, depende da atividade de água, de concentração da salmoura, do pH, da atmosfera, da flora competidora e da temperatura de estocagem do produto. Cada um desses fatores tem seu efeito percebido individualmente e, no caso de interação com outros fatores, o efeito é no sentido de afetar a probabilidade de crescimento.

O hambúrguer é um produto vitimado por surtos de salmonelose. Um dos maiores fatores contribuintes para a ocorrência de surtos em hambúrgueres é o consumo de produtos crus ou mal cozidos, contendo *Salmonella* em níveis infectantes.

5.1 Curso de Infecção

A *Salmonella* é transmitida principalmente por ingestão de carne e ovos de aves contaminados. Sua patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. Este microrganismo pode causar desde doenças graves como febre tifóide e febre entérica até doenças mais brandas como enterocolite ou salmonelose (FRANCO; LANDGRAF, 2001).

A enfermidade clínica causada ao homem pela ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* tem um período de incubação de oito a 36 horas, com os extremos oscilando entre cinco a 72 horas. A sintomatologia traduz-se por cefalgias, náuseas, vômitos eventuais, cólicas abdominais e diarreia, elevando-se raramente a febre a mais de 38°C.

Supera-se a fase aguda num período que vai de dois a cinco dias, mesmo que a febre e a diarreia ainda persistam por cerca de duas semanas. O mal estar e os efeitos mais danosos da infecção devem-se à desidratação e à toxemia. A morbidade é mais sentida pelas crianças menores e pelos anciões, grupos etários em que a letalidade é maior, ainda que sem maior expressão em seu conjunto. Há dados dando conta de que, em 1.169 casos de salmonelose nos Estados Unidos da América, em 1976, devidos ao consumo de alimentos, apenas três foram letais.

Diversos autores situam a taxa de letalidade devido à salmonelose em 4,1%. Os sintomas variam de indivíduo para indivíduo, não apenas de acordo com a resistência manifestada por cada um deles, mas também (e isto dita o curso de maior ou menor gravidade) em função da virulência e da carga microbiana contida no alimento. Se levado ao exame hematológico, a contagem leucocitária nem sempre se altera, levando à observação de neutrofilia. Quase sempre, as culturas de sangue são negativas.

Na fase aguda, o microrganismo pode ser isolado da matéria fecal. A presença dos microrganismos nas fezes diminui gradualmente, com redução de mais ou menos 50% na segunda semana, cerca de 15% na quarta e raramente perdura por mais de seis ou oito meses. Apesar da cura clínica, os que continuam excretando *Salmonella* são tidos como portadores.

As bactérias restantes se localizam em certos locais dos intestinos, na vesícula biliar, no fígado ou até nos fins, sendo excretada continuamente. Esta eliminação permanente de microrganismos pode perdurar por semanas, meses e mesmo por anos.

O que ocorre com o homem acontece também com os animais, que passam a comportar importantes reservatórios de microrganismos.

Desenha-se, assim, o quadro dos portadores assintomáticos. Foram descritos casos de portadores assintomáticos, que possuíam a bactéria na garganta ou a expeliam pela urina.

Os bovinos e outros animais, por exemplo, comportam-se como portadores assintomáticos, encontrando-se neles, com freqüência, salmonelas nas fezes, nódulos linfáticos, fígado, vesícula biliar, bexiga, rins, baço e ossos.

5.2 Dose infectante

Dado o significado do número de bactérias capaz de desencadear o processo infeccioso e de determinar sua gravidade, é preciso discutir a dose mínima infectante, mesmo porque esta noção orientará os padrões a estabelecer visando aos critérios de tolerância pontificados para os diferentes produtos.

Houve época em que se acreditava que o processo infeccioso era desencadeado através da ingestão de pelo menos 10^5 a 10^6 células vivas/g de alimento. Dependendo da espécie, as doses estabelecidas variavam entre 125.000 para a *Salmonella bareilly* e de 44,5 a 67,2 milhões para a *Salmonella anatum*.

5.3 Difusão e Fontes de Infecção

Segundo Sinell (1981), de acordo com dados de 1976, nos Estados Unidos, em 1.169 casos de infecção, 40% deviam-se à *Salmonella heidelberg* e cerca de 30% à *Salmonella typhimurium*, distribuindo-se o restante por outros 14 tipos. Na Alemanha, refere-se ele à prevalência da *Salmonella typhimurium*.

Para o ano de 1975, o mesmo Sinell (1981) elaborou um quadro representativo da ocorrência da salmonelose na Alemanha, onde são discriminadas como fontes mais freqüentes de infecção as carnes frescas e órgão animais, os embutidos e outros produtos cárneos, a carne picada, derivados de ovos de galinha, bem como cremes, pudins, e pasteis, além de alimentos vegetais. Do total de 1.806 casos registrados, 18,3% corresponderam a produtos cárneos.

Nestes casos, as espécies mais responsáveis foram a *Salmonella typhimurium* e a *Salmonella heidelberg*. No mesmo quadro, enumeraram-se 49 casos de salmonelose causados por contatos com animais.

Na Inglaterra, os agentes mais frequentemente responsáveis pelas salmoneloses são: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella panamá*, *Salmonella brandenburg*, *Salmonella stanley*, *Salmonella anatum* e *Salmonella heidelberg*, destacando-se a primeira como responsável por aproximadamente 50% dos surtos.

Rowe (1989), da Divisão de Patógenos Entéricos, em Londres, denunciou, em 1989, o incremento da ocorrência, na Inglaterra e País de Gales, de toxinfecções alimentares causadas pela *Salmonella enteritidis*, fagotipo quatro, originário da carne de galinha e da casca do ovo, tendo havido também, nesta ocasião, seu isolamento da gema de ovo. A ocorrência que, em 1981, era de 392 casos passou em 1988 para 12.522 casos.

À *Salmonella pullorum*, antes considerada específica das aves, caracterizada depois como zoonose, deveu-se, em 1975 a um grave surto na Iugoslávia, que se abateu sobre 205 soldados que consumiram embutidos inadequadamente armazenados.

A difusão das salmonelas é considerada universal. A infecção do homem e dos animais é normalmente adquirida mediante ingestão de alimentos contaminados por fezes contendo salmonelas. A contaminação por sólidos e líquidos realiza-se de forma direta ou indireta, registrando-se na literatura, para efeito didático, os quatro “efes” da língua inglesa: *food*, *fingers*, *feces* & *flies*, visando chamar a atenção para o papel desempenhado pelos alimentos, dedos, fezes e moscas.

Esta advertência estende-se aos cuidados que devem ser tomados com ratos e baratas. As bactérias procedem de gatos, cães, suínos, bovinos, aves e ovos, ovinos, eqüinos, coelhos, animais de zoológicos, répteis (inclusive ofídios), pescados e produtos lácteos. Considera-se fonte ponderável de salmonelas as cascas de ovos e os ovos líquidos, congelados ou em pó. As rações, normalmente as que contêm farinha de carne, de ossos e de pescado, podem também transmitir as salmonelas às aves e aos animais de corte.

5.4 Alimentos Implicados

Nas infecções humanas, são tidos como passíveis de conter organismos viáveis, todos os produtos de origem animal. Assim, independentemente da infecção endógena a partir de infecções fecais por eliminadores intestinais, incluem-se naquelas fontes as carnes frescas e

preparadas, aves, pescados, ovos e leite. As carnes e produtos cárneos estão entre os alimentos mais suspeitos. A carne picada conta-se entre as mais suscetíveis, a ponto de se exigir, na Alemanha, mediante legislação especial para contornar o problema, sua refrigeração e limitação de prazo para venda. São importantes as medidas impostas pelos serviços de saúde pública do Brasil, quando obrigam a moagem da carne, nos açougues, à vista do comprador. Também na Alemanha, houve tempo em que foi necessário impor normas restritivas ao comércio de ovos de patas crus, obrigando o seu cozimento para evitar a salmonelose.

Apesar do extraordinário avanço tecnológico nas áreas de genética, nutrição, manejo e a utilização de equipamentos modernos, que permitem produtividade avícola em níveis elevados, o impacto social e econômico das doenças de origem alimentar é considerável (OMS, 1988). Neste particular membro do gênero *Salmonella* continuam sendo um grave problema para a avicultura industrial, conseqüentemente, para a saúde pública, uma vez que o consumo da carne de frango é cada vez maior pela população (TESSARI *et al.*, 2003).

Embora todas as salmonelas possam ser reconhecidas como um patógeno potencial, atualmente são as “salmonelas paratíficas” que ameaçam a aceitação pública dos produtos avícolas (NASCIMENTO, 2000), sendo incriminadas como principais responsáveis pelos surtos atribuídos a doenças veiculadas por alimentos (ALVES *et al.*, 2001). Estas salmonelas estão presentes no intestino de aves saudáveis, sem detrimento para o hospedeiro, sendo porém, capazes de contaminar o meio ambiente e outras aves, através das fezes (VAUGHN *et al.*, 1974; BORLAND, 1975).

Dessa forma os animais por ocasião do abate raramente apresentam sintomas clínicos de salmoneloses, podendo originar produtos, para consumo humano e animal, contaminados (OMS, 1988). Por conseguinte, torna-se extremamente difícil evitar a contaminação das carcaças durante o abate pelo fato de que em condições de pré-abate, os contaminantes estão concentrados nas vísceras, superfície da pele e penas, no entanto, em função do processamento industrial os microrganismos se disseminam rapidamente entre as carcaças, seja por veiculação hídrica, contaminação cruzada da carcaça pelas vísceras (LEITÃO, 2002).

Representam também graves riscos os embutidos frescos como as linguiças, os hambúrgueres e outros que, embora cozidos, são expostos sem maiores cuidados de higiene e refrigeração. As carnes frescas e órgãos animais se incluem neste rol, bem como certos produtos expostos à venda em estufas insuficientemente aquecidas. De um modo geral, tem-se observado que os produtos não cozidos suficientemente ou que não estiveram sob refrigeração

apropriada são os que maiores riscos oferecem. A manipulação excessiva constitui um agravamento a mais.

O risco de toxinfecção por *Salmonella* assume um caráter especial quando se atenta para o fato de que sua presença no alimento não é denunciada pelo aspecto ou sabor.

São ainda passíveis de conter salmonelas, podendo funcionar como veículos de infecção, o pescado defumado, vegetais diversos e, ocasionalmente, a farinha de soja. Alinham-se também os produtos lácteos, como os queijos brancos, gelados e cremes, bem como saladas, molhos, pratos preparados, moluscos e coxas de rãs. Dá-se ainda bastante importância ao contágio por força da chamada contaminação cruzada.

5.5 Resistência

A resistência das salmonelas varia dependendo dos tipos, mas geralmente é elevada. A *Salmonella* tem como temperatura ótima para o seu crescimento 37°C, muito embora cresça bem em temperatura ambiente, tanto acima quanto abaixo daquela. Cresce melhor em alimentos não ácidos. O melhor pH para seu crescimento está entre quatro e meio e nove e a atividade de água mínima varia com o tipo de alimento, mas é aproximadamente de zero noventa e três a zero noventa e cinco. São destruídas quando submetidas a 60°C por 15 minutos, podendo sobreviver por semanas na água destilada e por um período ainda mais longo nas águas puras do que nas poluídas, em virtude da falta de competição biológica. Não resistem à exposição direta aos raios solares por mais de oito horas, porém suportam bem a dessecação, resistindo por 12 horas à luz direta.

As salmonelas podem sobreviver por longos períodos nas pastagens. A *Salmonella dublin* demonstrou resistir por cerca de três anos em fezes secas e por aproximadamente dez meses nas paredes de edifícios. Resistem na terra úmida por um ano e por 16 meses na terra seca.

Crescem bem nos alimentos cárneos à temperatura ambiente, havendo pesquisadores poloneses, segundo Thornton (1969), que demonstram, mediante culturas, que a *Salmonella typhimurium* cresce inicialmente em carne decomposta, alcançando o nível mais alto no décimo dia para, então, decrescer rapidamente, até desaparecer no vigésimo dia. Diz-se que é capaz de se manter viável por dias, nos cadáveres de animais.

Nas águas com matérias albuminóides, como ocorre às águas residuais de matadouros, as salmonelas multiplicam-se ativamente. Nas carnes curadas, resistem até 75 dias e, em

embutidos, de 41 a 64 dias. É reconhecida sua resistência ao sal. A concentração máxima de NaCl que permite seu crescimento é de dez por cento e a mínima é de 0,93%.

Experimentos de Nickerson; Sinskey (1985) comprovam que, a despeito de sua velocidade de crescimento ser menor a temperaturas mais baixas, constatou-se crescimento a dez graus centígrados, só parando de crescer completamente quando submetidas a temperatura abaixo de seis virgula sete graus centígrados. Os mesmos pesquisadores, trabalhando com frangos preparados com creme de recheio e presunto salgado, inoculados com diferentes espécies de *Salmonella*, verificam que estes organismos podem aumentar seu número a temperatura de 45,5°C, mas que, indubitavelmente, observa-se uma diminuição de seu crescimento a 46,6°C. Em perus recheados, não se evidenciou a diminuição do número de salmonelas até as temperaturas que vão de 60°C a 65,6°C, medidas no ponto de crescimento mais lento.

A pasteurização, que se caracteriza pelo aquecimento de 60°C a 62°C durante três a quatro minutos, tem a finalidade de destruir as salmonelas dos ovos líquidos congelados e ovos desidratados.

Como regra, deve-se levar em conta, na diminuição das salmonelas, o binômio temperatura-tempo.

Recomenda-se, de modo geral, como tratamento térmico, as mesmas temperaturas empregadas contra os estafilococos em alimentos, isto é, o aquecimento a 66°C por 12 minutos, ou a 60°C de 78 a 83 minutos.

5.6 Ocorrência no Brasil

Giorgi (1982), em São Paulo, de 1966 a 1971, visando à identificação de portadores de salmonelas, examinou 3.020 amostras de fezes de nove espécies de animais domésticos, a seguir determinada:

Bovinos (500 amostras); suínos (600); eqüinos (400); ovinos (100); caprinos (100); caninos (300); felinos (170); leporinos (350) e aves (500). Essas amostras foram colhidas durante o abate, em matadouros localizados nos arredores da capital de São Paulo, encontrando-se todos os animais aparentemente sãos durante a inspeção *ante mortem*. Os bovinos procediam de Minas Gerais, Mato Grosso e do próprio estado de São Paulo; os suínos originavam-se dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina; os eqüinos, dos estados de São Paulo e Minas Gerais; os ovinos, do estado de São Paulo e Rio Grande do Sul; caprinos,

leporinos e aves, somente do estado de São Paulo. Dos cães e gatos, colheu-se o material em clínicas do município de São Paulo, de animais sem qualquer sintoma clínico de febre, diarreia ou vômito. O autor isolou 217 salmonelas, o que correspondia a 7,2% das 3.020 amostras examinadas. 147 amostras, ou 24,5% corresponderam aos suínos; 35 ou 8,7% aos eqüinos; 13 ou 2,6% às aves; nove ou 1,8% aos bovinos; três ou 1,7% aos felinos; cinco ou 1,6% aos caninos e cinco ou 1,4%, aos leporinos. De caprinos e ovinos não foi isolada nenhuma salmonela.

Quanto ao grupo sorológico a que pertenciam as salmonelas isoladas, 56,7% pertenciam ao grupo sorológico B; 23,7% ao grupo E; 11,5% ao grupo C; 4,6% ao grupo D e 4,1% ao grupo L. De todas as espécies animais examinadas, excetuando-se ovinos e caprinos, isolaram-se salmonelas do grupo sorológico B, tendo sido, ao todo, isolado 17 sorotipos diferentes, dos quais 14 correspondiam aos suínos.

Em mais de 70% dos isolamentos realizados, os sorotipos mais freqüentes foram representados pela *Salmonella derby*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella anatum*, com predomínio da *Salmonella derby* nos suínos e *Salmonella typhimurium* nas aves, cães, gatos e coelhos e da *Salmonella anatum* nos eqüinos. A *Salmonella Dublin* predominou nos bovinos. Em suas conclusões, o autor apontou, entre os animais domésticos, os suínos seguidos dos eqüinos e das aves, como os principais portadores de salmonelas no Brasil, considerando em plano secundário bovinos, cães, gatos e coelhos. Mostrou serem as carnes e produtos derivados as principais fontes potenciais veiculadoras de salmonelas para o homem.

O trabalho de Giorgi (1982) é considerado importante, pela profundidade de suas pesquisas e análises. No entanto, o gênero *Salmonella* continua sendo dos mais estudados em nosso meio. Nos trabalhos de inspeção sanitária, é grande o interesse em torno do diagnóstico, controle e medidas preventivas, quer pelos riscos passíveis de ocorrer no mercado interno, quer pelas exigências dos importadores de nossas carnes e derivados.

5.7 Prevenção

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, cujos padrões epidemiológicos diferem de uma região para outra. Isto se deve a diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos e criação de animais e nos padrões de higiene e saneamento (OMS, 1988).

Para prevenir a salmonelose, deve-se obedecer a alguns princípios fundamentados no intuito de evitar a contaminação dos alimentos manipulados por homens doentes e provenientes de animais igualmente doentes ou portadores de materiais contaminados como carnes, ovos e ingredientes em geral. Deve-se atentar ainda para as possibilidades de contaminação cruzada.

A rigor, com relação a eventuais portadores assintomáticos, deveria ser incluído o exame de fezes entre os exames periódicos normalmente exigidos aos manipuladores de produtos comestíveis. Para os portadores positivos, a medicina recomenda o afastamento do manipulador até que o exame de seis coproculturas chegue a resultados negativos.

Se os microrganismos já contaminaram os alimentos, deve-se, visando à sua destruição, tratá-los pelo calor mediante o cozimento, a pasteurização e outros meios adequados.

Os estabelecimentos de carnes, tanto os produtores como os armazéns, câmaras frias e redes de distribuição, devem adotar cuidados higiênicos com o pessoal, tomando as medidas recomendáveis. A higiene deve ser feita não somente através da limpeza e desinfecção sistemática do equipamento, instalações em geral e utensílios, mas também mantendo-os livres de insetos e roedores.

As medidas de higiene devem ser tomadas a partir de pontos como currais, apriscos, e pocilgas, onde, através das fezes, dos bebedouros, etc., as enfermidades são transmitidas, sobretudo quando se prolonga a permanência dos animais. Naturalmente que, com a presença de suínos, tais possibilidades aumentam.

A existência de animais doentes ou portadores de salmonela requer cuidados especiais nos trabalhos desenvolvidos a partir das operações seguintes à insensibilização. Assim, a despeito do banho que antecede o atordoamento, a lavagem das carcaças com vestígios de fezes na pele e nos pêlos deve ser eficiente e eficaz, evitando-se ao máximo a ocorrência de contaminações no ato da esfolação. Medida mais acertada seria a obrigatoriedade de, no banho dos animais vivos, serem usados desinfetantes e mesmo substâncias ou compostos contra o mofo.

O ponto crítico a seguir é a prática da evisceração, obrigatoriamente precedida, nos bovinos, pela oclusão do reto e da porção cranial do esôfago, realizadas com a devida cautela no sentido de evitar a ruptura dos intestinos.

Medidas mais radicais de precaução devem ser adotadas em relação aos animais abatidos emergencialmente. Existem países que os afastam sistematicamente do consumo ou,

como é o caso da Alemanha, que submetem sua carne a exame bacteriológico rigoroso. Os vitelos são sempre as vítimas de maior suspeição, ao lado dos eqüídeos.

Outra medida consiste em impedir o desenvolvimento das bactérias mediante refrigeração sistemática dos produtos armazenados ou expostos para a venda, submetendo-os a temperaturas sempre abaixo de 4,4°C, incluindo-se neste cuidado os alimentos desidratados inconvenientemente embalados.

Devem-se também adotar cuidados especiais com as rações destinadas aos animais, em particular as farinhas de carne, de ossos e de pescado. Os animais se infectam ao consumi-las. Tais produtos, mesmo aqueles acima citados e que são produzidos em temperatura mais elevadas, em razão das freqüências das recontaminações devem ser embalados imediatamente após sua produção, com envoltórios apropriados. Contudo, é natural que existam falhas. Daí, a tentativa de tratamento posterior ao envasamento. Este propósito, a ser realizado por intermédio de ar quente, tem a desvantagem de destruir alguns elementos nutritivos daquelas farinhas. Contornando-se esses inconvenientes, os Países Baixos tratam a farinha de pescado com raio gama. Recomenda-se ainda a proteção das rações através de peletização, meio eficiente de prevenção da salmonelose.

A educação sanitária de todas as pessoas envolvidas nos processos de produção e comercialização é medida imperativa.

6 SHIGELLA

A shigelose, também conhecida em outros países como disenteria bacilar, não foi ainda suficientemente estudada em importantes aspectos que conduzam a um controle eficiente. Sabe-se que esta bactéria é frequentemente encontrada em águas contaminadas com fezes humanas.

6.1 Curso da infecção

Os sintomas mais comuns da shigelose se apresentam como diarréia com fezes sanguinolentas, dores abdominais intensas, vômitos, febre e prostração acentuada. A presença de sangue nas fezes faz suspeitar desta infecção, diferenciando-se da salmonelose. O curso da infecção produzida pela *Shigella dysenteriae* é mais grave, podendo provocar uma toxemia que leva ao colapso. Nos casos mais graves, surgem complicações como septicemia, pneumonia e outras manifestações, inclusive peritonite e artrite.

O período de incubação pode alcançar até sete dias, situando-se a média em torno de quatro dias.

Afirmado que o índice de mortalidade na shigelose é mais elevado que na salmonelose, Nickerson; Sinskey (1985) referem-se à estatística elaborada em 1966 nos Estados Unidos, onde, para 73 casos fatais ocasionados pela salmonelose, 86 corresponderam à shigelose. Sinell (1981) reporta-se a uma grave epidemia devida a shigelose que, no período de 1968/69, ocasionou 12.000 mortes na América Central.

A convalescência da enfermidade é lenta, com recaídas frequentes. Doentes poderão tornar-se portadores do microrganismo e eliminá-lo pelas fezes. A infestação permanece, porém, por um período em média mais curto que quando infestado pela salmonelose, não ultrapassando algumas poucas semanas.

São conhecidas relativamente poucas espécies de *Shigella*, citando-se: *Shigella dysenteriae* (anteriormente designada *Shigella shigae*), *Shigella schmitzii*, *Shigella sonnei*, *Shigella alkaescens*, *Shigella flexneri* (anteriormente *Shigella paradysenteriae*), *Shigella ambigua* e *Shigella boudii*. Nunca ficou comprovado ser a *Shigella dispar* uma espécie patogênica. As espécies mais comumente responsáveis pela shigelose são a *Shigella flexneri* e a *Shigella sonnei*.

Tendo em vista características antigênicas, as shigelas não são classificadas pelos mesmos processos usados para classificar as salmonelas, realizando-se a identificação principalmente pelas suas características bioquímicas, em especial pela fermentação de açúcares. Semelhantemente às salmonelas, as shigelas comportam-se como facultativas quanto à necessidade de oxigênio, crescendo bem na presença ou ausência deste.

6.2 Dose Infectante e Modo de Ação

Ao contrário do que ocorrem com a salmonelose, poucas células podem provocar do desencadeamento da infecção.

As shigelas agem mediante uma endotoxina, que é um lipopolissacarídeo liberado por ocasião da lise da célula. As culturas de vários dias tendem à dissolução. Nas infecções produzidas por shigelas, libera-se a endotoxina após a lise dos microrganismos localizados nos intestinos, determinando os referidos fenômenos gastroentéricos.

Entre as diversas espécies, a *Shigella dysenteriae* é a mais nociva, demonstrando, nos meios de cultura, a faculdade de, além de endotoxina, produzir também uma exotoxina, capaz de afetar o sistema nervoso e intoxicar animais de laboratório.

As shigelas podem resistir a diversos antibióticos, fato que aumenta ainda mais sua gravidade.

6.3 Transmissão e Alimentos Implicados

Tem-se como regra que a shigela se transmite através do contágio homem a homem, funcionando o alimento como veículo transmissor. Além da água, são vetores da enfermidade do leite, verdura, frutas e saladas, bem como pratos preparados com lagostins, ovos, etc.

Produtos cárneos perecíveis não servem de veículo comum para as shigelas. Quando a transmissão ocorre por conta desses produtos como veículos, comumente a contaminação se origina de um manipulador (portador ou doente). Em muitos surtos, o manipulador toca o alimento que não é, a seguir, cozido, mas mantido por várias horas numa temperatura favorável ao crescimento da *Shigella*. A facilidade com que as shigelas se transmitem de pessoa a pessoa através do contato, sugere que a dose infectante mínima deve ser baixa. Níveis infectantes de dez a 100 foram descritos em experimentos com voluntários humanos.

Devido à alta capacidade de infectar da *Shigella*, qualquer produto cárneo perecível, desde que contaminado, torna-se seu veículo.

6.4 Resistência

Segundo Sinell (1981), são contraditórios os dados a propósito da resistência do germe. Sobrevive 170 dias no leite e na farinha e apenas umas poucas horas em evacuações de baixo pH.

Em todos os casos, a sobrevivência prolonga-se mais, quando se encontra em baixas temperaturas.

Segundo Nickerson; Sinskey (1985), é possível que as shigelas sejam destruídas pelo calor, nas mesmas condições que as salmonelas. Aham eles provável que elas comecem a morrer a temperaturas próximas de 46,6°C.

6.5 Prevenção

Considerando-se a possibilidade de sua contaminação a partir do homem, a prevenção da shigelose deve ser fundamentada, basicamente, nas medidas de higiene do pessoal, evitando-se qualquer forma de contato direto ou indireto com as fezes de doentes ou portadores.

Medida liminar, aplicável também a outras infecções desse tipo, é o afastamento de todos os operários que tenham desarranjos intestinais, a fim de submetê-los a exame de fezes visando à identificação do agente causal.

De resto, como regra geral, deve-se manter rigorosamente a higiene dos estabelecimentos, sem descuidar do afluxo de moscas, já que estas contaminam os alimentos por veicularem microrganismos.

A despeito das dúvidas que ainda persistem quanto à resistência das shigelas a baixas temperaturas, é melhor se manter sempre os alimentos a temperaturas inferiores a 4,4°C.

7 ESCHERICHIA COLI

A *Escherichia coli* foi isolada pela primeira vez em 1985, de fezes de crianças, por Theodor Von Escherich, e em 1986 foi bem descrita, sendo considerada por Escherich e Bienstok como participante da microbiota entérica normal do homem e dos animais (CORRÊA; CORRÊA, 1992). As infecções ou toxinfecções por *Escherichia coli* passaram a ser denominadas de colibaciloses, sendo os animais e o homem igualmente susceptíveis (SHARF, 1972).

Escherichia coli são bastonetes Gram negativos, catalase positivos, oxidase negativos e anaeróbios facultativos, fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, a maioria dos isolados fermenta a lactose e faz parte da flora intestinal normal (cerca de 10^6 microrganismos/g) (FORSYTHE, 2002). A definição do grupo coliforme, no qual se inclui a *Escherichia coli*, na edição de 1975 do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, é a de que ele envolve todas as bactérias gram-negativas em forma de bastonete, não formadoras de esporos, aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas, que fermentam a lactose com formação de gás em 48 horas, a 35°C.

A *Escherichia coli* é a espécie comensal predominantemente na microbiota anaeróbica facultativa do trato gastrointestinal dos humanos e dos animais de sangue quente (FORSYTHE, 2002). É também de um modo em geral um comensal inofensivo, mesófilo típico que cresce na faixa de temperatura de 7°C à 37°C, sendo que algumas cepas enteropatogênicas crescem a 4°C. As cepas patogênicas são classificadas de acordo com a sua ação no hospedeiro, podendo ser enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EaggEC), uropatogênicas (UPEC), neonatalmeningite (NMEC), e facultativamente enteropatogênicas (FEEC) (JAY, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 2001).

As cepas de *Escherichia coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como microrganismo indicador, a presença de *Escherichia coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como microrganismo potencialmente patogênico transmitido por alimentos, as reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novo significado, em

especial quando as condições do meio em que se encontram permitem sua multiplicação (FRANCO, 2002).

Escherichia coli encontra-se no grupo de coliformes, as quais a maioria das cepas faz parte da microbiota intestinal normal, e muitas outras cepas podem ser causadoras de diarreia e doenças graves como a síndrome urêmica hemolítica (HOBBS, 1999; TRABULSI *et al.*, 2004).

As enfermidades produzidas por linhagens enterotoxígenas ou invasoras de *Escherichia coli* são bastante difundidas. A *Escherichia coli* tem como habitat os intestinos do homem e de muitas espécies animais.

São conhecidas muitas linhagens de *Escherichia coli*, das quais se identificaram 15 sorotipos diferentes. Até 1982, segundo Kornacki; Marth (1982), conheciam-se três tipos de *Escherichia coli*: *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). A ETEC tem sido considerada a causa mais comum da “diarreia dos viajantes”, como surtos documentados. Associa-se a EPEC com surtos de diarreia infantil e neonatal (raramente de origem toxinfeciosa). A EIEC produz a enterite tipo *Shigelose*, que pode se originar do alimento ou da água. Todos os três tipos podem ser encontrados em humanos infectados, tendo o excremento fecal como fonte primária.

Todos os surtos de origem alimentar atribuídos a esses microrganismos são direta ou indiretamente ligados à contaminação fecal humana. Isto é, como lembram Doyle; Schueni (1984), supõe-se que o alimento tenha sido exposto à água não tratada e contaminada por esgoto doméstico, ou a um manipulador contaminado.

Riley *et al.* (1983) mostram que, em 1982, durante a investigação de dois turnos de colite hemorrágica nos EUA, a *Escherichia coli* 0157:H7 foi, pela primeira vez, reconhecida como um microrganismo enteropatogênico.

Hambúrgueres de uma cadeia de restaurantes de refeições rápidas, localizada em Oregon e em Michigan, foram epidemiologicamente tidos como veículo de transmissão. Não existem provas suficientes de que a *Escherichia coli* 0157:H7 seja mesmo de origem animal. Têm havido casos de colite hemorrágica na ausência de história recente de contato com animais. Estudos recentes sobre a destruição de *Escherichia coli* 0157:H7 em carne moída mostram ser ela mais por nove meses a -20°C com pequena alteração na sua quantidade.

Reis *et al.* (1980) relatam o isolamento de cepas de *Escherichia coli*, produtoras de enterotoxinas LT (temolábil) de hambúrgueres, salsichas de verão e outras carnes.

7.1 Modo de Ação

Linhagens da *Escherichia coli* enteropatógena (EEC) são tidas como uma das causas principais da chamada “diarréia dos viajantes”, também conhecida como “doença dos turistas”, por se disseminar na época do turismo em massa.

O contágio é realizado geralmente através da cadeia homem-alimento-homem. Os doentes eliminam as bactérias em grande quantidade pelas fezes, contaminando facilmente suas mãos e vestes.

Quando adoecem animais, geralmente novos (em especial bezerros, suínos, ovinos e aves), há dúvidas se a cadeia infecciosa animal- homem tem algum sentido ou até mesmo se ela existe. A cadeia homem – águas residuais – alimento – homem é habitual. Daí, a infecção ocorrer mais comumente onde as deficiências de saneamento básico, de higiene pessoal e dos estabelecimentos industriais permitem as contaminações fecais.

7.2 Curso da Infecção

O curso da infecção depende se o agente causal é pertencente ao grupo das linhagens invasoras ou infecciosas, ou ao das *formadoras de enterotoxinas*. No primeiro caso, ocorre uma infecção semelhante à disenteria, com multiplicação de bactérias no cólon. As linhagens formadoras de enterotoxinas provocam sintomas caracterizados por acessos de diarréia profunda, com acentuada desidratação do doente.

Em geral, a gastroenterite proporcionada pela *Escherichia coli* enteropatógena produz, além da diarréia, dores abdominais, náuseas, vômitos, febre, calafrios, cefalgia e mialgia.

O período de incubação deste agente varia de cinco a 48 horas, com a média ficando entre dez a 24 horas.

7.3 Alimentos Implicados

Entre os agentes transmissores da *Escherichia coli*, além da água para bebida, contam-se os mais variados alimentos, com importante papel reservado ao leite e seus derivados. A carne e seus derivados são também importantes veículos, bem como todo os alimentos excessivamente manipulados.

Alguns caracteres, relativamente à ação que exercem sobre os alimentos, emprestam ao grupo coliforme relevo especial. Assim, eles crescem bem em muitos substratos, utilizando-se de numerosos compostos hidrocarbonatos e outros compostos orgânicos como fontes de energia, bem como de compostos nitrogenados muito simples para suprir suas necessidades de nitrogênio. Dispõem de capacidade para sintetizar a maioria das vitaminas de que necessitam; crescem bem em larga faixa de temperaturas; produzem, a partir dos açúcares, apreciáveis quantidades de ácido e gás e podem provocar sabores anormais. O *Enterobacter aerogenes*, do mesmo grupo, produz mucosidade e viscosidade nos alimentos.

7.4 Como Indicador de Higiene

No estudo de *Escherichia*, independentemente do grande interesse pelas linhagens enterotoxigênicas e pelas invasoras, sua detecção e enumeração nos alimentos vale como importante elemento indicador de higiene.

A presença de *Escherichia coli* na água indica que esta possui uma contaminação microbiana de origem fecal humana ou de outros animais de sangue quente, ou seja, qualquer microrganismo patogênico que provoque doença no trato gastrointestinal desses animais pode também estar presente. Portanto, a *Escherichia coli* é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; FRANCO; LANDGRAF, 2001). De acordo com a Resolução RDC n. 518, de 25 março de 2004, para água de consumo humano, devem estar ausentes bactérias do grupo coliformes totais e termotolerantes, quanto aos padrões microbiológicos.

Efetivamente, a detecção de elevado número de coliformes num alimento, inclusive nos alimentos processados, é indicativo da presença de microrganismos de origem fecal. Há quem afirme, no entanto, que a pesquisa de microrganismos de origem fecal indicaria limpeza e não segurança, e que esta seria somente obtida pela pesquisa de organismos patogênicos. Rotineiramente, contudo, não sendo o alimento suspeito recebe preferência ao teste para detecção de microrganismos indicadores e não à pesquisa de patógenos, por ser aqueles de mais fácil cultura e identificação. A presença de *Escherichia coli* não exclui a possibilidade da existência de outras enterobacteriáceas (por exemplo, *Salmonella*).

7.5 Prevenção

Cuidados especiais devem ser tomados com as águas de abastecimento, com a higiene dos operários que manipulam alimentos e com a limpeza e desinfecção do equipamento, instalações e instrumental em geral. Devem-se tomar cuidados também no uso adequado das técnicas das oclusões, no momento da evisceração dos animais abatidos.

É igualmente importante a cocção adequada e a guarda dos alimentos sob refrigeração, depois de manipulados em atmosfera controlada.

8 VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Dentre os microrganismos considerados patogênicos, largamente incriminados nas disseminações de casos e ou surtos de enfermidades por consumo de pescados marinhos, encontra-se o gênero *Vibrio* spp., o qual possui algumas espécies como *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*. Nos últimos 30 anos, várias espécies desses microrganismos, que vivem em ambientes aquáticos, têm sido proclamados como vetores de doenças transmitidas ao homem (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2004).

A vibriose causada pelo halófilo *Vibrio parahaemolyticus* se inclui entre as toxinfecções alimentares que provocam gastroenterite. São conhecidos os surtos ocorridos no Japão e que atingiram, de certa feita, mais de 20.000 pessoas.

Beuchat (1982) afirma que a descrição do *Vibrio parahaemolyticus* como patógeno de origem alimentar de significância urgente pode ou não ser comprovada. Doença e morte em razão dessa bactéria foram documentadas no Japão desde 1950.

Em outubro de 1950, ocorreu no Japão um surto de envenenamento alimentar em que, de 272 pessoas acometidas de gastroenterites aguda, 20 morreram. O alimento suspeito de ter causado o envenenamento alimentar foi o “shirasu” um produto preparado pela fervura da sardinha em água salgada, com secagem parcial (BEUCHAT, 1982). Exame laboratorial do “shirasu” e do material de autópsia revelou a presença de dois tipos de bacilos como possíveis agentes causadores do envenenamento. Publicou-se um relatório do caso dando como a principal causa, infecção mista de *Proteus morganii* e *Pasteurella parahaemolytica*. Este foi o primeiro caso de envenenamento alimentar pela bactéria hoje conhecida como *Vibrio parahaemolyticus*.

Nos EUA, o primeiro surto documentado de gastroenterite, dando o *Vibrio parahaemolyticus* como seu possível agente causal, foi em 1969. Mas o primeiro surto confirmado, nos EUA, ocorreu em 1971 (DADISMAN *et al.*, 1973). Distúrbios resultantes do consumo de alimentos contaminados com *Vibrio parahaemolyticus* têm sido reconhecidos na maioria dos países.

No entanto, só recentemente reconheceu-se o significado do *Vibrio parahaemolyticus* em muitos laboratórios de saúde pública.

8.1 Curso de Infecção e Modo de Ação

Na vibriose por *Vibrio parahaemolyticus*, os sintomas apresentados são: dor no epigástrico, náuseas, vômitos, diarreia e, por vezes, evacuações mucosas e sanguinolentas. Geralmente presente, a febre não é, porém, muito elevada.

Segundo Beuchat (1982), os sintomas comuns da doença, por ordem de frequência, são: diarreia aquosa (98%), câibras abdominais (82%), náusea (71%), vômito (52%), dor de cabeça e febre (27%) e arrepios (24%).

O período de incubação, para Beuchat (1982), dura entre 12 e 17 horas, perdurando os sintomas entre um e dois dias, podendo se estender até a dez, mas com duração média de três. Há estatística que mostram intervalos extremos, no período de incubação, de dois a 48 e de quatro a 96 horas.

Em conjunto, a sintomatologia se aproxima muito daquela apresentada pela salmonelose. Uma variante da infecção tem curso similar ao da disenteria. Acrescente-se que a infecção é mais própria dos meses de verão.

Beuchat (1982) lembra que infecção extra-intestinal causada pelo *Vibrio parahaemolyticus* tem sido observada em feridas expostas de pessoas que nadam no mar.

No mínimo, três hemolisinas biologicamente ativas foram isoladas, as quais podem contribuir para a ocorrência dos sintomas da gastroenterite. O *Vibrio parahaemolyticus* produz endotoxinas similares àquelas produzidas pelas enterobactérias, que podem também participar da sua patogenia (BEUCHAT, 1982).

8.2 Dose Infectante

Em experimento com voluntários, uma dose de 10^7 de bactérias viáveis provocou a enfermidade ao fim de cinco horas. A dose que provoca a infecção, segundo Barros (1977), depende da estirpe e oscila entre 10^6 e 10^9 células viáveis.

8.3 Difusão

Muito difundida no Japão, a vibriose por *Vibrio parahaemolyticus*, segundo Sinell (1981), foi responsável por 70% dos surtos causados por toxinfecções alimentares (60% dos casos). Naquele país, as intensivas investigações realizadas durante o verão em quase todas as águas costeiras, que possuem grande carga de sujeira, resultaram positivas.

Não há referencia de surtos na Europa. O risco, entretanto, do seu surgimento ali não está afastado, uma vez que houve relato de um surto, em um cruzeiro para o Caribe.

Nos Estados Unidos, isolou-se o agente causal de amostras colhidas nas costas da Flórida e de Washington. Comprovou-se aí a sua presença em concentrações de 10^3 a 10^4 por grama, em amostras de caranguejo em conserva, fazendo supor que ele agride também o homem.

8.4 Fontes de Infecção e Alimentos Implicados

Encontra-se o *Vibrio* em moluscos, crustáceos e peixes marinhos crus. Devem-se incluir também as saladas de macarrão e hortaliças.

Acredita-se que, ocorrendo a enfermidade por ingestão de alimentos não oriundos do mar, possivelmente a contaminação se deva a portadores humanos ou à água marinha.

Em pescado branco, o germe prolifera em concentrações de 10^7 a 10^8 por grama em sete horas, em face de uma sementeira de 10^3 por grama. Não se multiplica, porém, no atum e na cavala (escombrídeos).

Não se descarta também a possibilidade de a enfermidade ter se desenvolvido a partir de vibriões viáveis veiculados por rações.

8.5 Resistência

As células do *Vibrio parahaemolyticus* não são esporuladas nem particularmente termorresistentes.

A suscetibilidade à inativação térmica depende muito das condições a que o microrganismo se submete no espaço da cultura, bem como do meio no qual está suspenso durante o tratamento pelo calor. A resistência à inativação térmica parece ser maior para as células cultivadas em temperatura elevada. Por exemplo, Beuchat (1982) relata que o valor de D 47°C para uma cepa Kanagawa positiva de *Vibrio parahaemolyticus*, foi de 5,3 minutos para células cultivadas a 21°C , comparado com 48,2 minutos para aquelas cultivadas a 37°C . A resistência ao calor também aumenta quando as células são aquecidas juntamente com alimentos marinhos, em meio contendo NaCl e pH próximo à neutralidade (BEUCHAT, 1982).

Sendo um organismo mesófilo, é provável que não prolifere a 10°C ou menos. O *Vibrio parahaemolyticus* é também sensível aos efeitos letais de congelamento e da refrigeração, sendo que a última geralmente causa letalidade mais alta. Como na inativação pelo calor, as taxas de morte a temperaturas reduzidas são influenciadas pelo meio.

Há evidências de preocupações com a contaminação pelo *Vibrio parahaemolyticus* de alimentos marinhos mesmo após estocagem prolongada, já que o microrganismo parece permanecer viável em ostras congeladas por um período tão longo como 130 dias (JONHSON, 1973).

8.6 Ocorrência no Brasil

No Brasil, diversos trabalhos de pesquisa demonstram a presença de *Vibrio parahaemolyticus*.

Barros (1977) relata pesquisa no qual encontrou índices relativamente altos de amostras de diferentes espécies de peixe colhidos nos litorais do Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro. Em amostras de água colhidas no litoral de São Paulo, dependendo do local e época da amostragem, Leitão (2002) encontrou incidências variando de 2,5% a 88,4%, com valores médios de 38,4%. Em 1976, também no litoral de São Paulo, o mesmo autor detectou uma contaminação de 100% nas amostras de ostras (*Crossostrea brasiliensis*), com uma população média de $8,1 \times 10^3$ em ostras frescas. Em amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e de camarão-sete-barbas (*Xyphopenaeus kroyeri*), revelaram-se baixos índices de contaminação, num total respectivamente de 3,3% e 6,6%.

Também em 1976, Barros (1977) estudou a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em camarões e ostras colhidos na baía de Sepetiba, litoral do estado do Rio de Janeiro, e encontrou, em 50 amostras de camarões *Penaeus (Litopenaeus) schimitti*, Burkenroad, 19 contaminadas (38%), com uma população média de $13,22 \times 10^3$, apresentando uma variação nas contagens de $2,8 \times 10^3$ a 60×10^3 células viáveis, utilizando a técnica do N. M. P. em amostras de ostras *Crossostrea rhizophorae*, revelou-se a contaminação de 100%, mas com uma população muito baixa: $3,02 \times 10^3$ vibriões por grama da amostra, oscilando entre $7,4 \times 10$ e $7,6 \times 10^3$. Neste experimento a respeito da capacidade hemolítica das estirpes isoladas de camarões, nove (15,78%) se revelaram Kanagawa positivas no Wagastsuma médium e, das 90 culturas isoladas de ostras, 13 (14,44%) apresentaram o fenômeno de Kanagawa. As culturas

sacarose positiva (153) foram diferenciadas e revelam uma elevada proporção de *Vibrio anguillarum* (83,7%) e 11,6% de *Vibrio alginolyticus*.

Realizaram-se muitos outros trabalhos pertinentes em nosso meio. Assim, Rodrigues (1983), estudando a ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas no ecossistema água-ostra da baía de Sepetiba, RJ, isolou, além do *Vibrio parahaemolyticus*, os seguintes: *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio harveyi*.

8.7 Prevenção

Uma medida preventiva de caráter geral seria a de não se consumir pescado cru procedente de áreas contaminadas, sobretudo no verão. Este objetivo, no entanto, é bastante difícil de ser atingido no que se refere às ostras, dado o hábito existente de consumi-las cruas. Daí, a necessidade da depuração sistemática dos moluscos em geral. Tratando-se de um halófilo, deverá contribuir decisivamente para a redução da flora.

Atentando-se para os resultados de diversos experimentos, conclui-se que a população de *Vibrio parahaemolyticus* aumentou de um a dois log., na estocagem de ostras nas conchas, a 25°C, por três dias, ao passo que perdem sua viabilidade quando armazenadas a 4°C a 8°C, o *Vibrio* ainda se multiplica com rapidez.

Os crustáceos devem ser mantidos sob refrigeração na fase de captura, armazenagem e comercialização até que, no ato do consumo, venham a ser cozidos.

Além dos cuidados gerais com a higiene do estabelecimento, do pessoal, de equipamentos e instrumentais, cabe à inspeção higiênico-sanitária na indústria verificar as possibilidades de contaminação cruzada. Efetivamente, a existência de eventuais portadores e a possível contaminação do ambiente podem ser responsáveis pela recontaminação de produtos em processamento ou já processados. Ademais, evitar-se-á o uso, para qualquer fim, de água do mar passível de contaminação.

Num país de clima quente como o Brasil, à depuração sistemática dos moluscos deverá seguir a manutenção sob refrigeração (4°C) ou congelamento, até o consumo.

9 YERSINIA ENTEROCOLITICA

Durante muito tempo, a *Yersinia enterocolitica* não teve sua identificação perfeitamente definida, apresentando características próximas às dos microrganismos *Pasteurella pestis*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Bacillus malei*, *Loeflerella whitemore* ou *Actinobacillus lignieresii*. Mais tarde, as amostras isoladas com aquelas características foram classificadas como *Bacterium enterocoliticum*. Outros estudos mantiveram as terminologias *Pasteurella pseudotuberculosis* tipo “b” e *Pasteurella* “x”, até que Mollaret; Destombes (1964) propuseram o nome generico de *Yersinia* em 1964.

Além da *Yersinia enterocolitica* propriamente dita, o gênero *Yersinia* passou a englobar as espécies *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*, um participante da família *Enterobacteriaceae*.

Não se sabe ao certo se as descobertas seguintes, relativamente freqüentes, tanto no homem como nos animais, foram conseqüências de sua maior ocorrência ou se devidas aos melhores elementos taxonômicos para sua identificação. Mas o certo é que estudos posteriores contribuíram no sentido de, com base em seu comportamento bioquímico, estabelecer cinco biótipos.

Em 1970, na Romênia, Lucinesco *et al.* (1970), ao relatarem duas pequenas epidemias humanas que acometiam operários de uma salsicharia, suspeitaram do suíno como possível transmissor, sem, contudo, poder comprová-lo.

9.1 Difusão

A *Yersinia enterocolitica*, agente de toxinfecção, vem sendo isolada do homem, dos alimentos, domésticos e selvagens, com crescente freqüência, preocupando médicos e veterinários sanitaristas. A sua distribuição geográfica ainda não seta bem definida, embora se suponha ampla.

A *Yersinia enterocolitica* ocorre em casos esporádicos de doenças humana desde 1939. Estudos limitados de certas nações desenvolvidas responsabilizaram-na por 1-3% de todos os casos de enterites humanas (GENIGEORGIS, 1981).

Há referencias Sinell (1981) de que o primeiro surto devido à *Yersinia enterocolitica* deu-se em 1966, atacando 66 indivíduos. Já em 1974, notificaram-se mais de 4.000 casos. Em 1984, 13 de 26 pessoas apresentaram sintomas gastrintestinais após o consumo de peito de

peru comercialmente pré-cozido. Amostras continuadas de produto similar revelaram a presença de *Yersinia* spp. Não se relatou nenhum dado posterior sobre surtos, tendo lugar somente as suposições (GENIGEORGIS, 1986).

9.2 Modo de Ação e Curso de Infecção

Os sintomas mais comuns da infecção no homem, de acordo com Morris; Feeley (1976), são: febre, dores abdominais e diarreia. De conformidade com Marks *et al* (1980), a diarreia é o maior sintoma (podendo ocorrer vômito) associado à yersiniose e ocorre, em 98% dos casos, em crianças de Montreal, no Canadá.

Os mesmos autores relatam que a maior parte dos isolamentos obtidos no curso das infecções humanas fizeram-se por amostra de sangue e de linfonodos mesentéricos. Informam ainda que, testando um voluntário, foi necessária uma dose de $3,3 \times 10^9$ microrganismos para produzir a infecção. As deduções revelam que são necessários milhões de células para causar a doenças.

Sinell (1981), ao se referir à sintomatologia, mencionar as formas freqüentes de linfadenite mesentérica, enterocolite, artrite e septicemias, acrescentando que alguns autores alertam para a semelhança com a salmonelose.

Zen-Yoji *et al* (1974), no Japão, concluíram que, primária ou secundariamente, talvez sejam os suínos as mais importantes fontes de infecção tanto na ocorrência de casos esporádicos como na de surtos. Isto, depois de detectarem diversas *Yersinia enterocolitica* em carnes de consumo.

Com base em pesquisa sobre a *Yersinia enterocolitica* em conteúdo intestinal e em carne de bovinos, no Japão Inoue; Kurose (1975) concluíram aventando a hipótese de o bovino também funcionar como reservatório de tipo humano.

É considerada uma zoonose com a maior rota de transmissão, o alimento e a água contaminados com fezes e urina animal.

Dos vários portadores animais, o suíno parece ser o maior reservatório para infecções humanas (BOTTONNE, 1977).

Hurvell (1978), diz que os dados clínicos e epidemiológicos, no entanto, sugerem que a maioria das infecções, tanto no homem como nos animais, ocorre através do trato digestivo, aduzindo que o suíno teria importante papel como reservatório na infecção do homem e ainda,

que os alimentos contaminados com *Yersinia enterocolitica*, tanto primária como secundária, parecem constituir importante fator na ocorrência de surtos.

Na Bélgica, em 1971, encontrou em suínos o sorotipo três de *Yersinia enterocolitica*, representado por cepas idênticas às que predominam largamente no homem, naquele país. Os bovinos, ao contrário, não parecem ser portadores regulares do sorotipo três. Os suínos, no entanto, albergam normalmente estirpes de outros grupos sorológicos.

Inoue; Nagao (1976), em pesquisa realizada no Japão, relatam o isolamento de *Yersinia enterocolitica* em: 10,3% de 145 amostras de conteúdo fecal de bovinos; 24,2% de 61 amostras de carne; 67,5% de 50 amostras de suínos; 40,0% de 40 amostras de aves e 23,7% de 228 amostras colhidas em casas de carnes.

Diversos outros trabalhos se referem ao isolamento de *Yersinia enterocolitica*, além do homem, nas amígdalas, da carne, do fígado, da língua, dos embutidos, das fezes de suínos, bovinos, eqüinos e cães e, em moscas, nestas últimas no meio rural do Japão.

Segundo Sinell (1981), enquanto a *Yersinia pseudotuberculosis* se encontra em toda a Europa e se apresenta em animais silvestres, a *Yersinia enterocolitica* é, antes de tudo, uma infecção do homem.

9.3 Alimentos implicados

Sinell (1981), ao confrontar o papel desempenhado pelos dois microrganismos, relata que, ao contrário da *Yersinia pseudotuberculosis*, comprova-se o desempenho da *Yersinia enterocolitica* como agente causal de infecções alimentares.

Numerosos alimentos alinham-se como possíveis veiculadores das toxinfecções pela *Yersinia enterocolitica*, em especial as carnes de suínos e de bovinos, além do pescado, do leite e da água não clorada.

A prevalência de *Yersinia enterocolitica* em carne fresca e leite é alta, não obstante muito poucos surtos de toxinfecções são relatados e nenhum causado por carnes.

No leite, Francis *et al* (1980), relatam que três em 36 *Yersinia enterocolitica*, isoladas do leite cru, produziram enterotoxina a 25°C, mas não a 4°C. Nenhuma das cepas pôde sobreviver à pasteurização. Concluíram que o leite é bom meio de cultura para o crescimento de *Yersinia enterocolitica*, mas pobre para produção de enterotoxinas (ST) a 4° e 25°C. Chamam eles a atenção para alguns importantes detalhes quanto à possível participação do leite em toxinfecções. Assim, o tempo requerido para a enterotoxina, sob crescimento em

ótimas condições (24 horas a 25°C e 12 dias a 4°C), indica que enterotoxina pré-formada é um problema sem maior significado para a saúde pública em relação a produtos de leite fluído. O problema potencial para a saúde pública estaria em produtos pasteurizados, uma vez que pequeno número de organismos sobreviventes à pasteurização, ou resultantes de contaminação posterior, cresciam significativamente durante a vida comercial do leite e produtos lácteos, mesmo sob refrigeração.

Hanna *et al* (1977), pesquisando a presença de *Yersinia enterocolitica* em carnes de bovinos e ovinos empacotadas a vácuo, detectaram organismos assemelhados a ela, em carnes estocadas por 21 a 35 dias a temperaturas de 1° a 3°C. O isolamento dos microrganismos deu-se mais frequentemente após 28 dias de estocagem sob vácuo que a condições ambientes normais.

Morris; Feeley (1976), revisando o estudo da *Yersinia enterocolitica*, referem-se à extensão de sua incidência em alimentos e ao seu isolamento, a partir de amostras de carne em mercados, carne de bovino embalada a vácuo, mexilhão, ostras, creme glacê e, também, na água clorada utilizada para beber.

9.4 Resistência

Estudos mostram que em pequeno inóculo de *Yersinia enterocolitica* pode alcançar milhões de células em carne fresca, após estocagem a 4°C – 7°C por duas semanas e, em leite, a 0°C – 2°C.

A *Yersinia enterocolitica* não mostra muita resistência ao calor e ao aquecimento de creme, a uma temperatura interna de 60°C, inativa níveis de 10⁶ células/g (HANNA *et al* 1977).

Experimentos de Hanna *et al* (1977) revelaram que a *Yersinia enterocolitica* não sobrevive em carne assada, em níveis máximos de 3,1 – 3,8 x 10⁴ células viáveis por grama, quando a temperatura no centro da peça é de 60 a 62°C. Alguns organismos sobreviveram a 51°C. A estocagem de carne sob congelamento ocasionou destruição intensa. O cérebro e o coração, sob infusão, revelaram que o crescimento de *Yersinia enterocolitica* foi superior em pH 7 e 8 do que nos de 6 e 9. Com pH 5, ocorreu pequeno ou nenhum crescimento.

Hanna *et al* (1977) refere-se à *Yersinia enterocolitica* como um dos poucos patógenos, para o homem, que cresce à temperatura de refrigeração, ou seja, de 0,5°C.

Hanna *et al* (1977) sugerem que o risco potencial da *Yersinia enterocolitica*, em alimentos, estaria associado ao aquecimento insuficiente ou à contaminação cruzada, efetuada por manipuladores de alimentos. A outros alimentos, também, se deveria a contaminação cruzada.

Segundo Stern (1980), observou-se uma ação bacteriostática e bactericida – do cloreto de sódio a 7% p/v, em caldo infusão de cérebro-coração a 3°C a 25°C sobre *Yersinia enterocolitica*.

Esta ação cresce em caldo com 5% de sal, porem não a 7%. Cresce, também, na faixa de pH situado entre 4,6 a 9,6 (STERN, 1980). A *Yersinia enterocolitica* não cresceu a 27°C, em carne curada, com 3% de NaCl em 156 ppm de NaNo₂, mas cresceu a 35°C. Estes estudos limitados indicaram que a *Yersinia enterocolitica* é mais sensível aos agentes de cura que outros enteropatogênicos (GENIGEORGIS; RIEMANN, 1979). Carnes processadas podem suportar *Yersinia enterocolitica* se os sais de cura estão presentes a baixos níveis.

Stern (1980) observam crescimento em pH de 4,6 a 9,0. As estirpes clínicas mostraram tolerâncias significativamente maior aos níveis de pH e de concentração de cloreto de sódio do que as estirpes do meio ambiente, a 25°C. Concluem que este fato sugere que a *Yersinia enterocolitica* se mostraria resistente a alguns métodos comuns de preservação de alimentos.

9.5 Ocorrência no Brasil

No Brasil, em 1969, segundo Mileti (1983), foram isoladas quatro cepas de *Yersinia enterocolitica* em sagüis de zoológicos, o que constituiu o primeiro isolamento na América do Sul. Refere-se, ainda, ao isolamento em 1970, de nova cepa do microrganismo em fezes de suíno.

Fontes *et al* (1978), na cidade de São Paulo, isolaram uma amostra de *Yersinia enterocolitica* das fezes de uma criança, biótipo 3, declarando ser esta a segunda amostra do microrganismo, de origem humana, isolada na América do Sul.

Mileti (1983), examinando conteúdo cecal, linfonodos mesentéricos e carne de suínos, em 50 amostras de cada, encontrou 8% de *Yersinia enterocolitica* positivos em resultado conteúdo cecal, 2% em linfonodos, com resultado negativo para carne. A biotipificação demonstrou pertencerem, as quatro estirpes isoladas do conteúdo cecal, ao biótipo quatro de Wauters e, dos linfonodos, ao biótipo dois. O mesmo pesquisador, contaminando lingüiça do tipo frescal com 10², 10³, 10⁴ e 10⁵ células bacterianas por mililitros, observou, de um modo

geral, a recuperação do microrganismo em todas as concentrações e nos diferentes períodos de armazenamento, de um a 14 dias, sob refrigeração à temperatura de 10°C.

9.6 Prevenção

Enquanto não se obtêm elementos mais seguros para o controle da yersiniose, as medidas de higiene ambiental e de asseio pessoal valerão como meio de defesa.

Em virtude da *Yersinia enterocolitica* ser capaz de crescer em alimento guardados, sob temperatura de refrigeração, tais alimentos contaminados inicialmente, mesmo com baixos níveis desse patógeno, poderão servir não só como veículo, mas também como meio de proliferação (STERN, 1982). De resto, há que se levar em conta sua maior sensibilidade ao calor.

10 STREPTOCOCCUS

A intoxicação alimentar por estreptococos, dentro da concepção de Sinell (1981), tem uma significação muito controvertida em relação à higiene dos alimentos

10.1 Microrganismos Implicados

Os estreptococos B hemolíticos, principalmente os do grupo sorológico A (*Streptococcus pyogenes humanus*), são responsáveis pela escarlatina e angina humanas, passíveis de transmissão mediante o leite e produtos cárneos. Outros do grupo sorológico N, como *Streptococcus latis*, *Streptococcus cremoris* e *Streptococcus diacetylactis*, inócuos do ponto de vista higiênico, são usados amplamente na indústria de laticínios.

O grupo sorológico D, o de maior importância como germes dos alimentos, conta com os enterococos propriamente ditos e, entre eles, com o *Streptococcus faecalis*, desempenhando um papel controvertido na gênese das intoxicações alimentares. O *Streptococcus bovis* e o *Streptococcus equinus*, embora pertencentes ao grupo dos estreptococos fecais, não desempenham praticamente nenhum papel sob aquele aspecto.

10.2 Curso da Intoxicação e Sintomas

Descrevem-se comumente intoxicações em que foram isolados enterococos. Na maioria dos casos, além dos estreptococos, isolaram-se também outras bactérias. Parece que o número de germes, as características dos substratos e a fase de desenvolvimento do microrganismo se revestem de certa importância na gênese dos fenômenos tóxicos. Levanta-se a hipótese de que algumas estirpes levem a intoxicações alimentares ou que este fato ocorra apenas com determinada flora contaminante.

Experimentos, com animais e com voluntários, proporcionaram escassas informações a propósito da atuação dos enterococos. Dos voluntários, apenas alguns manifestaram sinais patogênicos.

O período de incubação varia de duas a 36 horas e os principais sintomas são as náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, assemelhando-se, em partes às intoxicações produzidas pelo *Clostridium perfringens* ou *Bacillus cereus* e, também, à provocada pelo *Staphylococcus aureus*.

Uma das causas das intoxicações alimentares, impropriamente designadas por “intoxicações alimentares inespecíficas”, com a participação de germes normalmente apatógenos, seria a formação de produtos metabólicos que, apenas em determinadas circunstâncias, mostram-se tóxicos. Contam-se, entre estes produtos, as chamadas “pressoraminas” também denominadas “aminas biógenas”, originárias da descarboxilação de aminoácidos, como a histidina versus histamina, tirosamina versus tiramina, fenilalanina versus feniletilamina. Bactérias que também formam descarboxilases são as salmonelas e outras enterobacteriáceas, espécies de *Bacillus* e *Clostridium*, *Pseudomonas* e os próprios enterococos.

Experimentalmente, a administração simultânea de aminoácidos acompanhados de grande quantidade de *Streptococcus faecalis*, produtores de descarboxilase, provocou apenas casos isolados de reações. Assim sendo, a gênese da intoxicação alimentar por enterococos encontra nas aminas biógenas somente uma explicação parcial. Contudo, em determinados alimentos, a formação de histamina é um fenômeno típico, em que as bactérias atuantes parecem contribuir com um papel muito secundário.

Sinell (1981) chama ainda a atenção para alguns fatos, visando justificar as dúvidas quanto à participação dos enterococos nas intoxicações alimentares. Lembra ele a existência de numerosos alimentos contendo, em condições normais, quantidades variáveis de enterococos, como os produtos naturalmente fermentados, queijos frescos e brandos, embutidos crus maturados e ainda diferentes produtos curados, crus e cozidos, presunto cru e cozido, embutidos escaldados e diversos fiambres. Nestes produtos os enterococos são inócuos do ponto de vista higiênico. Considerados aí como parte da flora normal, não denotam a existência de contaminação fecal nem a condição de indicadores de higiene.

11 CAMPYLOBACTER

O *Campylobacter jejuni* (antes conhecido como *Campylobacter fetus* subespécie *jejuni*) é atualmente reconhecido como uma importante bactéria entérica patogênica do homem.

É um patógeno de importância em segurança alimentar largamente difundido sendo responsável por causar gastroenterites nas populações de nações industrializadas e de países em desenvolvimento (CARVALHO *et al.*, 2001).

Evidências epidemiológicas têm sugerido os produtos de origem animal, especialmente os produtos avícolas, como principal veículo para infecção humana, uma vez que o trato intestinal das aves domésticas tem sido demonstrado como o principal reservatório de *Campylobacter jejuni*, sendo detectado a partir de fezes de frango. Assim, durante o processo de abate, as carcaças e vísceras comestíveis podem ser contaminadas e o agente ser detectado no produto acabado, pronto para o consumo (CARVALHO *et al.*, 2001).

Estudos realizados em muitas partes do mundo mostram que o *Campylobacter* será tão ou mais freqüentemente isolado de pessoas com diarreia do que a *Salmonella* ou *Shigella* (BRUCE *et al.*, 1977; BLASER, 1979; PAI, 1979; DELORME, 1979).

Pelos fatos de muitas espécies de aves e mamíferos possuírem, freqüentemente, este microrganismo como integrante de sua flora intestinal, alimentos de origem animal são considerados como importantes veículos na transmissão de *Campylobacter* ao homem.

Os *Campylobacter* são víbrios microaerófilos, gram-negativos, móveis, pertencentes à família *Spirillaceae*. Também, antes conhecidos como “víbrios relacionados”, estes microrganismos são confirmados como patogênicos para os animais desde 1909 (BLASER, 1982).

O *Campylobacter jejuni* parece ser um comensal na flora intestinal de numerosos mamíferos e espécies aviárias. A proporção de isolamento em animais que servem de alimento, segundo diversos autores em vários países.

Os padrões microbiológicos para alimentos no Ministério da Saúde descrevem o *Campylobacter jejuni* como microrganismo infectante caracterizado como agente de infecção alimentar.

11.1 Alimentos Implicados

As aves são fonte potencial de infecção por *Campylobacter* para o homem por causa da ubiquidade desse microrganismo no conteúdo intestinal e carcaça de aves abatidas. Bovinos, ovinos e suínos também o albergam.

Todos os alimentos oriundos de animais dos quais tem sido isolado o *Campylobacter*, são considerados veículos potenciais de transmissão, quando não adequadamente pasteurizados ou cozidos. Partindo-se dessa premissa, os cuidados higiênicos e tecnológicos, durante a evisceração desses animais, são sumamente importantes. É provável que o controle da infecção do homem por *Campylobacter* melhore com o domínio da infecção nos animais que servem de alimento e com a prevenção da contaminação dos produtos de origem animal.

Carnes curadas perecíveis não evidenciaram a infecção por *Campylobacter*, mesmo que as cruas o pudessem carrear. Isto, provavelmente, se deve à sua sensibilidade ao calor e ao NaCl. O *Campylobacter jejuni* cresce em meio com concentração máxima no NaCl de 1,75 (HANNINEM, 1981).

A preservação de envoltórios naturais de suínos com NaCl pode ser ineficiente na rápida destruição de *Campylobacter*, especialmente à temperatura de refrigeração. Em países onde se consomem muitos embutidos de porco e produtos correlatos, eles se tornariam numa fonte adicional de infecção para o homem.

Blaser (1982), relatando resultados de exames de carne vermelha crua, feitos em laboratórios de saúde pública, na Grã-Bretanha, num total de 6.169 amostras, registraram o isolamento de 98 casos de *Campylobacter jejuni*. A sobrevivência de *Campylobacter jejuni* isolados comumente de aves e carne picada de suínos e bovinos comercializados foi testada. Observaram que a bactéria sobrevivia por uma semana em alimento mantido a 4°C e por três meses sob congelamento a - 20°C. Nenhuma das amostras testadas sobreviveram mais de 15 minutos ao tratamento pelo calor. Recomenda-se prevenir a infecção por meio da correta manipulação da carne e do tratamento pelo aquecimento, no mínimo a 60°C por 15 minutos.

Pesquisas sobre a contaminação de carne vermelha por *Campylobacter jejuni* constataram que este, usualmente, atinge baixa densidade (1 a 10/cm²), se isolado em área do flanko e não da anca. O microrganismo foi isolado, em menor frequência, de carcaças refrigeradas e vitelo desossado.

Franco (1987), em amostras de fígados de aves, colhidas em São Gonçalo, RJ, isolou-se 100% de *Campylobacter jejuni*, alertando para o risco do consumo desses alimentos insuficientemente cozidos.

12 CLOSTRIDIUM BOTULIUM

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria esporogênica, anaeróbia, comumente encontrada em solos, sedimentos marinhos e de águas doces, bem como no trato intestinal de homens e animais. Condições industriais inadequadas podem ocasionar o seu desenvolvimento e este, por sua vez, produz toxina se lhe forem dadas condições como potencial redox, pH, temperatura e umidade. As maiores são os legumes (57%), pescados (15%), frutas em conservas e condimentos, incluindo o mel (8%).

A despeito de rara ocorrência, em razão de sua gravidade o botulismo é considerado a mais séria das toxinfecções alimentares.

Tendo como ponto de partida as atividades culturais e sorológicas, segundo referência de Smith (1980), as espécies foram divididas em grupos. Suas toxinas são classificadas, de acordo com a especificidade sorológica, em sete tipos, caracterizados pelas letras de A a G. Também de acordo com a homologia dos valores de DNA e RNA de cada grupo, bem como na uniformidade dos produtos pirolíticos, podem ser subdivididas em quatro grupos distintos. Diversas cepas produzem neurotoxina; entretanto os efeitos farmacológicos são similares mesmo possuindo estruturas proteicas diferentes. Todas as cepas são mesófilas, com crescimento ideal entre 25°C e 37°C, e se desenvolvem melhor em pH próximo à neutralidade, tendendo ao alcalino (7 a 7,4). Entretanto, a do tipo E pode se desenvolver e produzir toxinas em temperaturas muito baixas, assim como certas cepas são passíveis de se desenvolverem em pH mais baixo (teoricamente, pH abaixo de 4,6 impede seu crescimento, portanto em conservas de frutas e hortaliças não há desenvolvimento adequado, ao contrário de produtos cárneos onde pode se multiplicar) (PLANETA, 2003). Os grupos são divididos em:

Grupo I. Compreende as linhagens antes chamadas ovolíticas, que englobam todas as do tipo A e as proteolíticas dos tipos B e F. umas poucas linhagens dos tipos C e D são ligeiramente proteolíticas, mas se incluem no grupo III.

Grupo II. Compreende as linhagens não proteolíticas dos tipos B e F e todas as do tipo E.

Grupo III. Compreende as linhagens dos tipos C alfa, C beta e D.

Grupo IV. Compreende as linhagens proteolíticas, mas não sacarolíticas do grupo C.

Os esporos mais resistentes dos tipos A e B são caracterizados por valores D₂₅₀ da ordem de 0,10 a 0,20 minutos. Estes dois tipos são consideravelmente mais resistentes que o

tipo E; por isso, são de maior importância na esterilização de alimentos enlatados de baixa acidez (STUMBO, 1965).

A temperatura ótima de crescimento é de 37°C para o tipo A, 30°C para o tipo E, e a temperatura mínima é de 100°C para os tipos A e B, e 3 a 4°C para o tipo E. Quanto à germinação de esporos, é de 15°C. A maioria dos estudos de termorresistência foram feitos com os tipos A, B e E, os mais comumente implicados em toxinfecções alimentares. Essa resistência depende de vários fatores como natureza do alimento, tipo e cepa do *Clostridium*, meio em que se desenvolvem os esporos, temperatura em que foram gerados, idade (os jovens são mais resistentes), número existente, pH e atividade de água. Os esporos tipo A são considerados mais resistentes à ação do calor, decorrendo daí o perigo de ordem sanitária, sobretudo em relação às conservas alimentícias. Seguem-se os tipos B e F, e E. Conceituou-se que alimentos com valor de atividade de água igual ou abaixo de 0,85 não exigem um processamento para destruir o *Clostridium botulinum*.

Culturas de *Clostridium botulinum* dos tipos A, B, E e F, as quais são responsáveis pelo botulismo humano, são enquadradas em dois grupos com diferentes características, não relacionadas com o tipo de toxina. Estes grupos diferem primeiramente no que diz respeito a proteólise, mas também tem diferenças quanto ao antígenos somáticos, DNA e formação de esporos. As resistências ao calor desses esporos, seu crescimento e baixas temperaturas e sua tolerância ao sal também são diferentes. São conhecidas as características proteolíticas das cepas tipo A, e não proteolíticas do tipo E, porém o tipo B e F possuem cepas com e sem capacidade de proteólise. Embora as cepas proteolíticas possuam a capacidade de ativar suas próprias toxinas, as não proteolíticas não podem fazê-lo, portanto, necessitam de “tripsinização” para a sua máxima toxicidade. Cepas proteolíticas são incapazes de crescer em temperaturas inferiores a 10°C, mas são relativamente tolerantes ao sal, e seus esporos são altamente resistentes ao calor. Cepas não proteolíticas podem crescer a 3,3°C e possuem baixa tolerância ao sal. Seus esporos têm resistência ao calor mais baixa em relação aos proteolíticos (LYNT *et al*, 1982).

Monitorando o crescimento de *Clostridium botulinum* inoculado em queijo, Steeg *et al* (1995) verificam que, sob ótimas condições de crescimento, 12°C é aproximadamente a temperatura onde se observou o maior crescimento de cepas proteolíticas. As condições do processo tecnológico de queijo normalmente estão aquém do ótimo mencionado. O crescimento deste patógeno poderia ocorrer dentro de 8 semanas a 18°C sob condições ótimas

com pH 5,8 a 0,97. Estes mesmos autores ainda concluíram que temperaturas acima de 25°C, sobretudo entre 30 e 37°C, poderiam ser consideradas ótimas para o crescimento.

As neurotoxinas produzidas pelas diferentes cepas possuem efeitos farmacológicos similares tendo, entretanto, estruturas proteicas diferentes. São classificadas em oito grupos diferentes relacionando-se com as diferentes espécies de *Clostridium botulinum*. As neurotoxinas produzidas pelas diversas cepas de *Clostridium botulinum* possuem efeitos semelhantes, sendo que, entretanto, a suscetibilidade dos animais a esses efeitos varia consideravelmente, conforme a sua espécie e a da toxina presente. Assim, o homem é mais sensível as toxinas do tipo A, B, E e F, o bovino as do tipo C beta e D, os eqüinos a do tipo C beta, e as aves ao tipo C alfa e C beta (PLANETA, 2003).

Apesar de algumas diferenças em seu processo de síntese e intensidade de ação, as toxinas tem basicamente uma estrutura similar. Formam agregados ao associar-se com uma hemoaglutinina (não tóxica) e outros polipeptídeos (não tóxicos) que podem protegê-la quando de sua passagem pelo estômago. Purificadas, são polipeptídeos com peso molecular de 150K da sintetizadas a partir de subunidade H e L, de peso molecular 100 a 50K da respectivamente. Estas, isoladamente, são inativas biologicamente, permanecendo unidas por uma ponte S-S, com exceção da toxina C2. As toxinas são produzidas durante o desenvolvimento bacteriano e são liberadas quando o microrganismo sofre lise. Surgem a partir de precursores ligeiramente tóxicos, sintetizados com base em prototoxinas. Algumas cepas alcançam seu poder tóxico total a partir da ação de uma protease oriunda da própria bactéria, a qual atua sobre esse precursor, como é o caso das cepas do tipo A e algumas dos tipos B e F. Outras, entretanto, adquirem uma toxicidade parcial como consequência da ação de uma protease bacteriana, atingindo o poder tóxico total somente após tratadas com tripsina ou alguma outra enzima proteolítica exógena.

Algumas cepas do tipo E, ao contrário, sintetizam diretamente a toxina já completamente ativa, não necessitando de ação endógena ou exógena de qualquer espécie para seu poder total. É a ação desses metabolitos bacterianos a grande responsável pela intoxicação botulínica. Sabe-se, entretanto, que certos procedimentos básicos são capazes de inativar essas toxinas, como submissão ao calor de 80°C por dez minutos, por ação de formaldeído ou tratamento por tripsina em pH 7,5 ou ainda em digestão péptica a pH 1,8. A toxina do tipo A é a mais estudada, possivelmente por conservar bem sua toxicidade, produzir caldos de cultivo muito potentes em uma variedade de meios e por manter-se facilmente sob uma forma cristalizada estável. Sua síntese não está associada à esporulação do

microrganismo, ocorrendo independente e na ausência de divisão celular. As condições de aerobiose ou anaerobiose também não influem em sua produção, o que já não ocorre em relação ao suprimento de aminoácidos essenciais, fosfatos e glicose. A ação da toxina foi estudada amplamente, passando-se anos até que seus efeitos fossem totalmente identificados e seu foco de ação estabelecido.

Existem algumas controvérsias, mas sabe-se que as toxinas botulínicas bloqueiam a liberação dos neurotransmissores colinérgicos através do Ca^{++} intercelular, particularmente nas funções neuromusculares, o que resulta em paralisia progressiva das pernas, músculos respiratórios e nervos motores intracranianos. Não se sabe ao certo se a toxina chega a inibir ou alterar a produção da acetilcolina ou, apenas, se sua ação sobre as células nervosas inibe a ação destas na placa motora terminal. O músculo “envenenado” pela toxina não responde à neostigmina, um inibidor da colinesterase, porém contrai-se se exposto à ação da acetilcolina, comprovando que a toxina inibe a ação da acetilcolina na placa motora terminal. Esta é a prova de que não há ação direta da toxina sobre o músculo, uma vez que mesmo a presença da toxina botulínica, há resposta se o músculo for estimulado diretamente pela ação da acetilcolina (HARRISON, 1995).

Fisiologicamente, a acetilcolina é armazenada nas vesículas sinápticas em feixes denominados “quanta”, sendo liberada quando um impulso elétrico percorre o axoplasma. A acetilcolina liberada se combina com um ponto receptor da placa terminal do músculo, produzindo a contração. Seu excesso é inativado pela ação da acetilcolinesterase. Com base nos conhecimentos atuais, pode-se dizer que a toxina botulínica age em três etapas:

Fixação da toxina por meio do fragmento H aos receptores na membrana pré-sináptica, processo este que não requer energia ou íons Ca^{++} . Esta fase é reversível se administrado um soro antitoxinotico específico.

Internalização da toxina nas vesículas do neurônio pré-sináptico, com gasto de energia. Ocorre provavelmente por um processo de reorganização da membrana celular neuronal. É uma etapa irreversível. Etapa lítica, caracterizada por paralisia. Produz danos à estrutura da membrana citoplasmática e bloqueio da secreção da acetilcolina (PLANETA, 2003).

12.1 Botulismo

O botulismo é hoje uma doença relacionada mais à conservação e uso de embalagens inadequadas de um alimento, do que uma contaminação propriamente dita. Não ocorre por alterações do alimento causadas por bactérias e fungos que correntemente o contaminam, e sim por condições industriais que destroem ou inibem esses microrganismos, deixando caminho livre para que o *Clostridium botulinum* se desenvolva sem competição, e produza toxina se lhe forem dadas condições como potencial redox, pH, temperatura e umidade (PLANETA, 2003).

Desde épocas mais remotas relatam-se casos de indivíduos que apresentam sintomas característicos do hoje denominado botulismo, após a ingestão de alimentos mal conservados. Pode-se supor, com base nos conhecimentos atuais, que alguns alimentos devem ter sido os responsáveis pelo surgimento da doença entre nossos antepassados. É possível imaginar que um salmão conservado em um barril de salmoura demasiado diluída para ter propriedades bacteriostáticas, bem como arenques mal defumados oriundos do Mar Báltico ou trutas mal enlatadas na região da Escandinávia, ou outros tantos alimentos marinho mal conservados, tenham sido os primeiros alimentos veiculados dessa enfermidade alimentar, uma vez que a pesca era o principal dos povos da antiguidade.

Alguns pesquisadores foram bastante importantes no estudo do botulismo, como Justino Kerner, médico e poeta, que estudou medicina e literatura na Universidade de Turíngia, na Alemanha. Foi nomeado médico oficial do distrito de Wurttemberg, no mesmo país, onde se destacou como um grande mestre da poesia e pesquisador do botulismo, áreas pouco correlatas, mas desenvolvidas com grande competência. Recolheu dados sobre casos semelhantes ao botulismo, uma vez que estavam geralmente associados à ingestão de salsichas (“botulus” em latim). A doença também era conhecida como “doença de Kerner” dada sua dedicação às pesquisas. Observou que as salsichas eram veículos da doença apenas sob algumas condições. As que apresentam menor número de pequenas bolsas de ar sob o envoltório, constituindo de tripa animal, eram as que mais se tornavam venenosas. Isso sugeriu desde o início que o agente seria um organismo vivo anaeróbio facultativo ou estricto, o que foi comprovado posteriormente.

Em 1904, ocorreu um surto de botulismo em Darmstadt (Alemanha), e doze pessoas morreram após ingerirem uma salada de feijão em conserva. Este surto foi estudado por Landmann. Em 1919, Burke descobriu a diferenciação sorológica dos microrganismos. Daí em diante novas descobertas foram surgindo, chegando-se ao que hoje se conhece sobre o agente do botulismo, que passou a ser designado como *Clostridium botulinum*.

Entre 1899 e 1973, o Center of Disease Control (CDC) documentou 688 epidemias distintas de botulismo de origem alimentar, envolvendo 1800 pessoas, com taxa de letalidade de 55%. Nos últimos 30 anos o número de casos relatados sofreu um aumento considerável, provavelmente devido ao maior consumo de enlatados e conservas de contaminação são os legumes (57%), pescados (15%), frutas em conservas (15%) e condimentos, incluindo o mel (8%) (PLANETA, 2003).

12.2 Botulismo Infantil

O botulismo infantil é modernamente conhecido como uma das formas de botulismo, na qual os esporos de *Clostridium botulinum* ingeridos pela criança germinam, multiplicam e produzem toxina ao nível de trato intestinal, por este não apresentar-se ainda devidamente colonizado por microbiota característica (ARNON, 1981). As crianças afetadas apresentam constipações, hipotonia, neuropatias craniais múltiplas, seguidas por irritabilidade e dificuldade de sucção do leite, a qual se agrava à medida que a fraqueza se generaliza (BROWN, 1981). A morte resulta de algumas dessas causas: paralisia dos músculos intercostais ou ainda por complicações secundárias. Existem basicamente três tipos de características de botulismo infantil, que são divididas em grupos: paralisia discreta, não sendo necessária a hospitalização; paralisia moderada a severa, sendo necessária a rápida hospitalização; paralisia fulminante, quando a morte ocorre subitamente, sem nenhuma oportunidade para a hospitalização, e que na necropsia pode ser confundida com a síndrome da morte súbita infantil. O aleitamento materno parece oferecer proteção parcial contra a paralisia fulminante. Quando o botulismo ocorre em crianças amamentadas, a progressão é gradual, com tempo suficiente para a hospitalização e tratamento. No caso de crianças alimentadas com mamadeira, o botulismo infantil é mais associado ao grupo 3 (fulminante) (ARNON, 1981).

12.3 Curso da Enfermidade

A intoxicação é causada pela ingestão de alimento contaminado em que houve multiplicação da bactéria e formação da toxina. Os primeiros sintomas surgem entre uma hora e oito dias (18 a 36 horas em média) após a ingestão do alimento contaminado, caracterizando-se por: tontura ou vertigem; visão dupla ou turva; secura na boca; garganta e

pele; dificuldade para deglutir, falar e respirar; debilidade muscular descendente; constipação; dilatação ou fixação das pupilas e paralisia respiratória. A paralisia muscular inicia-se nos olhos e na face, passando depois para a garganta, peito, mãos e pernas para, havendo toxina suficiente no sangue, atingir o diafragma e músculos do peito, dando-se a morte por asfixia. Podem ocorrer sintomas gastrintestinais precedendo os neurológicos. À diarreia inicial pode suceder a paralisia dos esfíncteres anal e vesical.

A ocorrência de sintomas gastrintestinais é quase uma regra no botulismo do tipo E. Assim, de 1951 a 1968, no Japão, Smith (1995), descreve que, em 57 surtos que afetaram 319 pacientes, evidenciaram-se náuseas e vômitos em 85% dos casos. A toxina botulínica não afeta o sistema nervoso central e sim os nervos periféricos do sistema autônomo, ao nível das conexões mioneurais.

A duração da enfermidade é de um a dez dias. Nos casos mais graves, como na intoxicação pelo tipo E, foram registrados casos de morte entre a 20^o e a 24^o hora após a ingestão da toxina.

A letalidade depende do tipo de germe, variando nas diversas localizações geográficas. Assim, mencionam-se 76% na Inglaterra, 65% nos EUA, 41% na Dinamarca, 13,8% na Alemanha e 8% na França. Através do emprego de anti-soros polivalentes e da respiração artificial, decaíram as cifras de letalidade nos Estados Unidos em 12% em 1970 para 6% em 1979.

A morbidade situa-se entre 75 e 100%.

O tratamento com a antitoxina é mais eficaz contra o tipo E do que contra os tipos A e B.

Existem outros tipos de botulismo humano, além do alimentar. O botulismo por feridas dá-se mediante a contaminação de ferimentos por linhagens toxigênicas dos tipos A, B e C. Suspeita-se de infecção de feridas por *Clostridium botulinum*, quando não é possível atribuí-la aos alimentos e estão presentes sintomas de botulismo. Algumas experiências, no entanto, acusaram a existência de feridas infectadas com cepas toxigênicas dos tipos A e B, sem a presença de sintomas de botulismo. A literatura científica refere-se, ainda, ao botulismo infantil, que parece dever-se à ingestão de esporos por crianças menores de seis meses, num comportamento contrastante com o da ocorrência no adulto. Outra forma existente ainda, mas sem diagnóstico seguro, refere-se a um botulismo de classificação indeterminada que, nos Estados Unidos, estabeleceu-se como sendo responsável por alguns surtos havidos em 1977 e 1978.

12.4 Ocorrência no Brasil

Serrano; Scheneider (1982) afirmam que, no Brasil, até fins de 1981, não há relato científico que, indubitavelmente, confirme a existência de botulismo no homem. Os mesmos autores julgam ser a existência do botulismo em nosso meio, é principalmente teórico devido à escassez de pesquisadores com vivência prática do assunto e que os médicos, em geral, raramente se viram diante de caso que pudesse ser identificado como botulismo.

Deploram ainda a ausência de trabalhos publicados entre nós que apontem a frequência de toxinfecção, no Brasil, pelo *Clostridium botulinum*. Ou até uma descrição científica bem ordenada da contaminação humana, à luz dos conhecimentos atuais, o que seria o dado mais elementar a respeito do assunto.

Contudo, Santiago (1972) faz referencia a um único surto de botulismo, ocorrido no Rio Grande do Sul, Até o ano de 1958, em virtude da ingestão, por nove membros de uma família, de pescado em escabeche, preparado em casa. Todos os membros da família foram contaminados, falecendo sete deles, ou seja, 77%.

Mais tarde, acompanhados, sob certos aspectos, dois casos diagnosticados clinicamente como botulismo (um dos quais teve desfecho fatal) ocorrido em Duque de Caxias, RJ, Serrano (1990) comentou que havia sido apontado, como causa, um patê de galinha mal conservado, ainda que não apresentasse evidência de alteração e não tivesse sido submetido a exame laboratorial por ter sido desprezado o restante. Em outros gomos do patê, o exame laboratorial revelou a presença de *Clostridium botulinum* tipo B, constatação que permitiu a orientação terapêutica. Infelizmente, porem, ao que foi apurado, não tendo sido viável o exame do patê, também não foi realizado a pesquisa da toxina no soro ou fezes dos pacientes, condições estas que valeriam como prova irrefutável de botulismo.

Serrano (1990), consolidando estudos sobre a ocorrência de botulismo nas condições brasileiras, denunciando a presença de *Clostridium botulinum* em peixes, moluscos e crustáceos, além da detecção em solos.

Em relação aos bovinos, Tokarnia *et al* (1970) descreveram doença que ocorreram no Piauí, vitimando número apreciável de bovinos, em região com acentuada deficiência de fósforo, diagnosticando-se o botulismo, sob forma epizoótica, com base no histórico, nos exames clínicos de 15 animais e na necropsia de 14 deles, complementados por exames laboratoriais. As culturas do conteúdo ruminal, do intestino grosso e delgado, do fígado e de outros substratos revelaram a presença de toxina botulínica em um ou vários dos materiais

coletados e examinados. Testes de soro-proteção em cobaias indicaram tratar-se de toxinas dos tipos C e D. De onze amostras de solo do local, em oito foram obtidas culturas produtoras de toxinas.

12.5 Distribuição

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria esporogênica anaeróbia, comumente encontrada em solos, sedimentos marinhos e de águas doces, bem como no trato intestinal de homem e animais. A ocorrência desta bactéria em ambientes naturais tem sido descrita em vários países (DELAZARI; D'AVILLA, 1983). Com exceção do tipo C, são preferidos os solos alcalinos.

De reconhecida ubiquidade, o *Clostridium botulinum*, por meio de suas formas resistentes, os esporos, convive no ambiente tanto nativo como também em solos cultivados, podendo ser encontrado inclusive no lodo, em sedimentos e cursos d'água, lagos e águas costeiras. Tem-se buscado a existência de relação entre o microrganismo e as propriedades do solo. Assim, associado a presença de linhagens do tipo A a solos de reação neutra ou alcalina e com baixo conteúdo orgânico. Parece que os tipos E e F se associam frequentemente ao solo que permanece úmido na maior parte do tempo. No Japão, de 1800 amostras de solo obtidas ao longo de rios, lagos e costas de determinada região, 287 correspondiam ao tipo E, ao passo que se mostraram negativas as amostras colhidas em uma região do interior daquele país (PARDI *et al*, 1993).

Na América do Sul, a Argentina é o país onde há maior documentação de registros de *Clostridium botulinum*. No Brasil também se tem demonstrado a ocorrência natural desse patógeno. Ward; Carroll (1971) realizaram entre novembro e dezembro de 1966, trabalhos de isolamento de *Clostridium botulinum* tipo B e F, enquanto que as amostras coletadas no açude de Araras e no reservatório de Pentecostes, continham os tipos C e A respectivamente. No estado do Piauí, particularmente nos municípios de Guadalupe, Jurumenha, Itaquera, Floriano, José de Freitas e Campo Maior, Tokarnia *et al* (1970) isolaram os tipos C e D de amostras de solo coletados em locais onde se decompuseram cadáveres de bovinos, cujas mortes foram atribuídas ao botulismo.

Nos estados de São Paulo e Santa Catarina, em especial no Cabo de Santa Marta, Delazari *et al* (1982) realizaram estudo sobre a prevalência de *Clostridium botulinum* em pescados na região, e verificaram que este patógeno ocorre naturalmente nestes alimentos.

No Rio Grande do Sul, em Santa Maria, Saraiva (1978) isolou *Clostridium botulinum* tipo C de galinhas que apresentavam sinais de botulismo aviário.

A crença de que bactérias de tipo E encontradas em lagos e sedimentos marinhos tenham sido arrastadas de terras vizinhas, parece ser contrariada por estudos que comprovam que sua multiplicação ocorre nos ambientes aquáticos. Por outro lado, a presença de *Clostridium botulinum* no solo pode estar relacionada, inversamente, com a presença do microrganismo que inibem seu crescimento. Os animais podem se contaminar pelo consumo de vegetais, em virtude da contaminação existente no solo, águas e esterco (PARDI *et al*, 1993).

A presença deste microrganismo no intestino de peixes e vísceras de carangueijos e outros crustáceos, se deve a sua presença em águas.

Acredita-se na possibilidade de os tipos C alfa e C beta diferirem quanto ao habitat. Contudo, o C alfa tem sido encontrado frequentemente em aves, sedimentos e raramente no solo, enquanto o C beta se associa quase sempre aos mamíferos. Efetivamente, o intestino dos mamíferos costuma ser o habitat mais comum dos tipos C beta e D, que são incapazes de se manter em um número constante na maioria dos solos, a não ser sob condições de umidade e calor. Quando os animais morrem, desde que hospedem bactérias, poderão sediar a multiplicação das formas vegetativas seguida de aumento dos esporos, a ponto de, com sua desintegração no solo, provocarem a formação de zonas intensamente contaminadas por estes e permitirem a recontaminação e a continuidade do ciclo (PARDI *et al*, 1993).

12.6 Alimentos Implicados

A presença do *Clostridium botulinum* nos alimentos justifica-se em razão de sua ubiquidade. Enquanto os alimentos vegetais se contaminam com esporos existentes no solo, a carne, além desta via, possivelmente se contamina a partir da flora intestinal que, ocasionalmente, ao atravessar a parede do intestino, é arrastada pela linfa e corrente sanguínea até o fígado, onde é fagocitada, como mostra Smith (1995). A maioria desses surtos têm sido relacionada com o consumo de conservas de hortaliças e legumes, pescados, frutas e produtos cárneos mal conservados, e poucas vezes com alimentos industrializados (DELAZARI; AVILLA, 1983).

Alimentos de origem animal como carnes e seus derivados estão entre os mais incriminados na veiculação de *Clostridium botulinum* ao homem, sobretudo aqueles produtos

artesanais, ou mesmo inspecionados onde houve falhas em uma ou mais etapas do processamento (JUNEJA *et al*, 1997). O mel também pode ser um excelente veiculador de *Clostridium botulinum*, sendo que as toxinas tipos A e B são predominantes (HUHTANEN *et al*, 1981).

Alguns processos tecnológicos de conservação podem proporcionar condições para o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* como as embalagens em atmosferas modificadas. Isto é especialmente importante na conservação de pescados e derivados estocados sob atmosferas sem a presença de O₂. Mas outros fatores, além do potencial redox, são igualmente importantes, como temperaturas de estocagem, sendo o crescimento inversamente proporcional a esta, além de atividade de água elevada, pH neutro ou próximo à neutralidade, e umidade elevada (HARRISON, 1995; PETERSON *et al*, 1997). Um dos aditivos mais utilizados como agente antimicrobiano é o nitrito de sódio (NaNO₂), além de conferir também cor adequada a vários produtos cárneos como salames, presuntos, mortadelas, bacon etc. O nitrito de sódio age impedindo a germinação dos esporos de *Clostridium botulinum* e consequentemente prevenindo a formação de toxinas. Em virtude de seu caráter tóxico, somente se deve utilizar o mínimo de nitrito necessário para a inibição da bactéria, e esta quantidade é de 150 ppm. A legislação brasileira, por meio do regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece no artigo 372 que o emprego de nitrato e nitrito, de sódio ou de potássio, ou qualquer combinação entre eles só pode ser feita em quantidades tais que, no produto pronto para consumo, o teor de nitrito não ultrapasse 200 ppm ou 0,02%.

O tipo C foi encontrado na Dinamarca, em fígados de bovinos e suínos saudáveis, o tipo B, em fígados de bovinos e o tipo A, em uma perna de ovino.

Os surtos de botulismo devem-se sobretudo à contaminação de produtos domésticos, como as conservas de hortaliças, frutos, peixes e produtos cárneos, sendo excepcionais aqueles devidos a produtos preparados industrialmente. Na Alemanha, estimam-se em 90% os casos de botulismo oriundos de produção caseira, atribuindo-se a responsabilidade, até algum tempo, a embutidos de sangue, fígado e outras vísceras, preparados sem o emprego de nitrato e nitrito.

Em estatística, de 1899 a 1967, abrangendo 1.669 casos de botulismo nos Estados Unidos, não se identificaram os alimentos responsáveis em 69,8% dos casos. Os vegetais figuravam positivamente num percentual de 17,8%, em geral representados por feijão verde,

milho verde, beterraba, espinafre, aspargos e cogumelos, via de regra derivados de envasados domésticos. As frutas representaram 4,1% dos casos; o pescado, 3,6%; os condimentos, 2,2%; os produtos de carnes de bovino, 0,8%; os produtos lácteos, 0,5% e os produtos avícolas, 0,1%. Em termos gerais, os alimentos contaminados eram tidos como de acidez baixa ou média. Contudo, houve alguns casos de intoxicação por alimentos ácidos.

Tompkin (1980) resumiu os surtos de botulismos ocorridos nos EUA, Canadá e outros países, de 1899 a 1979, mediante o consumo de produtos carneos e avícolas. Ele relatou ainda nove surtos devidos à carne processadas comercialmente e 51 devidos a carnes processadas em ambiente domiciliar, nos EUA e Canadá, durante os anos de 1960 a 1979. Os fatores que contribuíram para a incidência de contaminação em carnes processadas foram: subprocessamento pelo restaurante, temperaturas inadequadas usadas pelo consumidor ou retalhistas, além de outros fatores não identificados. Considerando-se o volume das carnes perecíveis processadas e consumidas nos EUA e o péssimo uso dos produtos pelos consumidores, como se evidencia por outros problemas de origem alimentar, os registros relativos ao botulismo são negligenciáveis. O envolvimento de carnes perecíveis preparadas no ambiente doméstico, em surtos de botulismo, não é tão freqüente quanto o daqueles produtos vegetais e alimentos misturados (carne e vegetais) nos EUA. Isto devido ao volume limitado de carnes curadas preparadas em casa, à melhoria da educação e ao uso generalizado de refrigeração. Relatam-se, também, casos cuja causa é o atum envasado em latas defeituosas, o patê de fígado importado do Canadá e, num outro país, o presunto envasado.

Houve, recentemente, surtos de botulismo tipo E nos EUA, devidos ao pescado defumado, problema agravado pela refrigeração inadequada.

Os embutidos que, aliás, deram origem à nomenclatura científica, contam-se também entre os produtos carneos causadores de intoxicação botulínica.

Em estudos de 378 amostras de produtos cárneos conservados, encontraram cinco casos de *Clostridium botulinum* do tipo A e um do tipo B. outro autor detectou um caso do tipo B em 73 amostras de semiconservas de carne (1,4%).

Segundo Tompkin (1980), o botulismo derivado de carnes curadas permanece como um problema em certos países da Europa, incluindo-se a Polônia, a França e a Alemanha. Muitos dos surtos resultaram de cura caseira de presuntos, embora não sejam incomuns aqueles devidos a outras carnes processadas comercialmente.

A infecção freqüente de presuntos curados, secos, feitos em casa, nesses países, é atribuída ao uso legal de nitrato (somente) e não de nitrito (França), à lenta e desigual

penetração de cura e à cura a temperaturas que permitem o crescimento do *Clostridium botulinum*.

Genigeorgis *et al* (1986) demonstraram a faculdade que têm os tipos B e E de *Clostridium botulinum* não proteolítico de crescer em presuntos com osso (curado em salmoura com 21% na NaCl, 1.100 ppm de NaNO₂ e 2.100 ppm de KNO₃ a pH 5,8) e de produzir toxina depois de nove dias (tipo B) e onze dias (tipo E), a 8°C. Para minimizar este problema, deixaram-se os suínos descansarem antes do abate; usaram carne com pH < 5,8; usaram temperatura de cura ≤ 5°C; evitaram a exposição dos presuntos a temperaturas inadequadas, até que os valores de atividade de água sejam de ≤ 0,96.

A partir do momento em que as autoridades governamentais e a indústria de alimentos organizada passaram a considerar todo alimento como potencialmente contaminado pelo *Clostridium botulinum*, os casos de botulismo tornaram-se excepcionais.

12.7 Resistência

As células vegetativas do *Clostridium botulinum* são destruídas pelo calor, porém a temperaturas muito mais baixas do que as necessárias para exterminar os esporos. Este fato, porém, carece de praticidade, uma vez que, invariavelmente, encontram-se esporos juntamente com as formas vegetativas esporuladas, devendo, por esta razão, a termorresistência fundamentar-se no efeito das diversas temperaturas ou em outro tipo de ação sobre as formas resistentes.

A temperatura ótima para o desenvolvimento do germe é de 37°C para o tipo A e de 30°C para o tipo E, assinalando-se, como temperatura mínima, para os tipos A e B, a de 10°C; para o tipo E, entre 3°C e 4°C ou, mais precisamente, 3,3°C. Considera-se como temperatura mínima, para a germinação de esporos, a de 15°C e, como temperatura máxima, 45°C.

O germe inibe-se em alimento com pH baixo de 4,5 e em alimento com pH acima de 4,6 ocorre o seu crescimento e a produção de toxina. Numa revisão concernente ao efeito do pH sobre o crescimento do *Clostridium botulinum*, Ito & Chen (1978) mostraram que embora um pH de 4,6 iniba o crescimento de esporos no *Clostridium botulinum*, o pH mínimo em que o crescimento se inibe em um dado alimento será específico para aquele alimento e pode ser mais alto que o valor 4,6.

A maioria dos estudos de termorresistência foi realizada com o tipo A, B e E, os mais comumente implicados em intoxicações alimentares.

As velocidades de desnaturação térmica se expressam em valores D ou “tempo de redução decimal”, significando os minutos necessários para, a uma determinada temperatura, se reduzir a contagem viável de uma suspensão de esporos a uma décima parte de seu valor original.

A resistência térmica dos esporos depende da natureza do alimento, do tipo e cepa do clostrídio, do meio em que se desenvolvem os esporos, da temperatura em que foram gerados, de sua idade (sendo os jovens mais resistentes), da quantidade existente, além do pH do meio e da atividade de água.

Níveis de um esporo/1-7,1 lb, em produtos como bacon, presunto cozido, peru defumado e carcaça de galinha têm sido relatados por Tompkin (1980). Em contraste, segundo Genigeorgis *et al* (1986), os níveis máximos de 5,3 esporos/g podem ser encontrados em pescado. Ainda, a importância da carga inicial de esporos deve-se ao fato de que a possibilidade de crescimento é aumentada com o aumento dos níveis de *Clostridium botulinum* e outras bactérias patogênicas, permitindo que eles iniciem o crescimento sob condições mais adversas.

Consideram-se os esporos do tipo A os mais resistentes à ação do calor, decorrendo daí o perigo de ordem sanitária, sobretudo em relação às conservas alimentícias. Seguem-se em termorresistencia, os tipos B e F, com discordância entre alguns autores quanto à resistência dos esporos do tipo E. Enquanto Nickerson; Sinskey (1985) enfatizam a termorresistência do tipo E, comparando-a à do tipo A, Frazier (1993) refere-se à sua inativação em 15 minutos, à temperatura de 80°C. O último autor também considera os esporos dos tipos C e D menos resistentes ao calor do que os de tipos A e B.

Já a termorresistência dos esporos do *Clostridium botulinum* dependerá da temperatura em que se desenvolvem os cultivos.

Smith (1995) demonstrou que nos tipos A e B os esporos gerados a 37°C resistiram mais ao calor que os obtidos a 24°C, 29°C ou 41°C. o mesmo autor assinalou que os ácidos graxos do meio de cultura influíram na termorresistência dos esporos, sendo tanto maior a resistência quanto mais longa era a cadeia carbonada do ácido graxo. Importante também foi a concentração em ferro e cálcio do meio de cultura, sendo menor a termorresistência quando abaixo de um determinado nível.

O pH do meio em que estão os esporos também influi consideravelmente na sua termorresistência. Estando as carnes, peixe e a maioria dos legumes e hortaliças, como batatinha, vagem, espinafre, aspargo, ervilha, milho e outros, na classificação de baixa acidez,

ou pH acima de 4,6, admite-se que o *C. botulinum* possa crescer nestes alimentos, requerendo-se assim um processamento que destrua os esporos.

Outro fator que influencia a resistência térmica dos esporos é a *atividade de água* (a_w). Assim, para esporos do tipo E, à medida que decresce a atividade de água, o valor D cai progressivamente, dando-se também o decréscimo da resistência térmica. Os tipos B mostraram um comportamento semelhante, com um valor D_{110} muito elevado, a valores de $a_w = 0,2$ a $0,3$, decrescendo à medida que os esporos secavam-se. Convencionou-se, assim, que a baixa atividade de água, de valor $0,85$ ou menos, ao lado da condição de baixa acidez, não exigem um processamento para destruir o *Clostridium botulinum*.

Dentre as poucas informações a propósito da ação de germicidas sobre os esporos de *Clostridium botulinum*, destacam-se a atuação do cloro (água clorada e as soluções diluídas de hipoclorito), agindo de modo mais eficaz que os compostos detergentes clorados ou iodíferos, uma vez que estes requerem o dobro do tempo de exposição. As soluções cloradas são mais eficientes em meio ácido.

Tais esporos são relativamente resistentes à luz ultravioleta e também aos alcoóis, compostos fenólicos, compostos quaternários de amônio e mercuriais orgânicos. Os ácidos de etileno e propileno, o formaldeído e os ácidos e bases fortes os destroem, ainda que menos rapidamente. Também são letais para os esporos dos clostrídios, inclusive para o *Clostridium botulinum*, os ácidos ascórbicos e dehidroascórbicos neutralizados.

Quanto à resistência dos esporos ao sal (NaCl), os níveis máximos que ainda permitem o crescimento do tipo E são: $5,8\%$ a 30°C ; $5,1\%$ a 20°C e $4,3\%$ a 15°C . Determinadas linhagens de *Clostridium botulinum* crescem em alimentos com 7% de sal sem, contudo, conseguirem elaborar toxinas. Mas a concentração de 10% de sal inibe seu crescimento. Em experimento realizado com um tipo de carne picada à qual se adicionam $4,5\%$ de cloreto de sódio, demonstrou-se que a produção de toxina era influenciada pela temperatura de incubação, não se detectando toxina em três meses, a 30°C . Deve-se considerar que as concentrações ordinariamente empregadas para carnes, presuntos enlatados e outras conservas, não inibem convenientemente o crescimento do *Clostridium botulinum*; devem-se evitar concentrações de $6,2$ a 9% tendo em vista que aquele microrganismo pode gerar toxina sem modificar os caracteres organolépticos dos alimentos.

Segundo Genigeorgis; Riemann (1979), cepas não proteolíticas são incapazes de crescer com taxas acima de $5-6\%$ de NaCl e as proteolíticas, acima de 10% .

A ação do nitrito sobre os esporos, por sua vez, merece menção especial, considerando-se sua eficácia, em contraste com o risco decorrente da formação de nitrosaminas, consideradas cancerígenas. O nitrito na carne mantém um elevado potencial de oxi-redução. Isto faz com que o produto conserve condições de aerobiose, a ponto de se tornar o meio impróprio ao desenvolvimento de anaeróbios. Não aumenta ele, desse modo, a destruição de esporos, quando em tratamento térmico, mas inibe o crescimento dos que sobrevivem. A concentração de nitrito necessária à inibição do desenvolvimento de esporos presentes e da intensidade do tratamento térmico. Em investigação para se avaliar a sobrevivência do tipo B em carne submetida a três graus de intensidade de calor – escasso, normal, e excessivo – constatou-se que as concentrações requeridas para a inibição foram respectivamente de 500, 100 e 50 ppm de nitrito. Rotineiramente, admite-se a proporção de 150 ppm como concentração mínima capaz de inibir o *Clostridium botulinum*. A legislação brasileira permite nitrito residual na proporção de 200 ppm. Admitem outros autores que, se não fosse a participação do nitrito, o perigo da intoxicação botulínica inviabilizaria a preparação de conservas, na forma em que, atualmente, elaboram-se os produtos cárneos curados, submetidos à pasteurização, como o presunto enlatado. Ressalte-se, ainda, sua ação sinérgica à do sal.

Qualquer fator que possua afetar o nível do nitrito residual afetará também o grau de inibição do *Clostridium botulinum*. Para Tompkin *et al* (1980), aumentando-se os níveis de ascorbatos e isoascorbato para além de 200 ppm na formulação aumenta a taxa de depleção do nitrito. Esta taxa pode ser aumentada também através do decréscimo do pH. A 4,4°C a refrigeração inibe o crescimento da maioria das bactérias responsáveis pelas toxinfecções alimentares. No caso particular do *Clostridium botulinum*, demonstrou-se ainda que inóculos grande de esporo se desenvolvem entre os 31 a 45 dias da incubação, a 3,3°C, sendo ainda mais seguras as temperaturas de 2,2°C e 1,1°C. Em outro experimento, em que se utilizou a carne picada como substrato, ficou demonstrada a produção de toxina entre as temperaturas de 3 e 30°C, sem que ocorresse o mesmo a 1°C. Corroborando esta observação, Smith (1995) afirma que nos Estados Unidos não existe surtos de botulismos atribuídos à carne congelada, advertindo, porém, para a ocorrência deste entre os esquimós, onde são raros os casos devidos ao consumo de carne crua congelada ou não.

Embora morram continuamente os esporos em germinação, durante a estocagem de carnes curadas, diminui-se também o nitrito residual. Assim, estocagem muito longa de carnes

perecíveis pode resultar em um nível de nitrito residual incapaz de inibir a germinação dos esporos, no momento em que a temperatura do produto for inadequada.

Quanto à faculdade que têm os esporos de *Clostridium botulinum*, de resistir às radiações ionizantes, Frazier (1993) relata que a resistência aos raios gama apresenta considerável variação entre os tipos A e B, sendo que, para a maioria deles, os valores D, variam de 0,225 a 0,336 Mrad, ainda que alguns sejam mais sensíveis. Na carne de bovino guisada, os esporos menos resistentes do tipo E têm valores D de 0,125 a 0,138 Mrad.

Melhores resultados são alcançados quando se combinam mais de um processo, aplicando-se, por exemplo, uma dose de radiação inferior à normalmente requerida, associando-se: refrigeração, envase a vácuo, antibióticos, cura ou aquecimento. Assim, a resistência dos esporos do *Clostridium botulinum* ao calor é reduzida a um terço ou mesmo à metade, mediante o tratamento com uma dose de 0,9 Mrad de radiação gama.

A respeito da resistência das toxinas do *Clostridium botulinum*, sabe-se que, contrariamente à dos esporos (com exceção daquele tipo E) são elas relativamente termolábeis. Sua destruição pelo tratamento térmico depende do meio e do tipo de microrganismo produtor da toxina. Experimentos de laboratório demonstraram que a inativação das toxinas dos tipos A, B e C leva de 15 a 30 minutos, a 80°C. a radiopasteurização, no entanto, por si só não inativa a toxina botulínica pré-formada, como ocorre com a pasteurização pelo calor.

A despeito de o fato de ser o homem uma das espécies mais sensíveis ao botulismo, não há elementos suficientes para se avaliar a quantidade de toxina necessária para causar a sua morte ou para o cálculo da taxa de mortalidade. Contudo, supõe-se que as doses vão de sete doses letais/rato, que equivaleriam a uma dose parenteral para o homem, até quantidades muito superiores. Supõe-se ainda que a dose humana letal de toxina tipo E, por via oral, seja de pelo menos 500.000 doses letais/rato, enquanto dois pacientes sobreviveram ao botulismo após a ingestão de cerca de 240.000 DL/rato, respectivamente. É fato também conhecido a recuperação de um paciente que ingeriu umas 370.000 DL/rato de toxina tipo B. Contudo, doses bem menores seriam letais como, por exemplo, a ingestão de apenas uma porção de pimenta verde, de conservação doméstica, que, a despeito do paciente tê-la cuspido, provocou sua morte. O suco de pimenta continha 100.000 DL/rato de toxina do tipo A por mL.

12.8 Prevenção

Três aspectos chamam de pronto a atenção do higienista: o controle na indústria, na comercialização e os cuidados preventivos por parte do consumidor.

Segundo a Organização Internacional de Epizootias (OIE), algumas medidas devem ser tomadas na prevenção do botulismo, como: realização da determinação de títulos e tipos de toxinas de *Clostridium botulinum*, diretamente do local de criação, como silagens, e dos próprios animais se necessário. Assim, permite-se ter noção dos tipos de toxinas e de combatê-los de modo específico em casos de surtos.

As medidas devem centrar-se em impedir a propagação do agente causal e a produção de toxinas. Quando surgir um surto de botulismo ao nível de campo, deve-se sequestrar de imediato os alimentos suspeitos (rações, silagem), e só se administrar novamente depois de aquecê-los a 100°C. Nas primeiras 12 horas pode-se recorrer à soroterapia.

Ainda ao nível de campo, a OIE recomenda a administração de toxóides botulínicos de comprovada eficiência e inocuidade em áreas ameaçadas pela doença, em 2 aplicações e em intervalos de quatro semanas.

A prevenção passa também pela suplementação correta dos animais, evitando a carência de fósforo, manutenção de pastos limpos e sem cadáveres, água de boa qualidade, manejo adequado, respeitando a biologia e o conforto do animal.

O botulismo alimentar humano é prevenido pela obtenção de matérias primas de qualidade, manipulação higiênica, água de boa qualidade na indústria, limpeza e sanificação eficientes, controle de pragas, instalações limpas, respeito às condições de tempo e temperatura em processos de tratamento térmico, e resfriamento, acondicionamento e estocagem em condições ideais ao controle da multiplicação bacteriana e expedição e comercialização dentro dos padrões higiênicos estabelecidos pela legislação, e adoção de boas práticas de fabricação, e análise de perigos e pontos críticos de controle em nível de indústria e comércio varejista.

No âmbito industrial, independentemente do tratamento térmico no caso de conservas enlatadas, visando especificamente à destruição das formas vegetativas, esporos e toxinas do *Clostridium botulinum*, devem ser adotadas determinadas normas destinadas a criar um meio que não permita o crescimento do germe ou a formação da toxina.

O processamento industrial, desde a fabricação de carnes enlatadas não sensíveis até o tratamento térmico, como acontece com o *corned beef*, obedecerá à exigência mínima de esterilização, tendo em vista resistência do próprio esporo do *Clostridium botulinum* ou de qualquer outro, por acaso mais resistente. Assim, as conservas devem ser submetidas a

temperaturas que ofereçam o máximo de segurança, atingindo no mínimo graduações de temperatura capazes de destruir as toxinas do *Clostridium botulinum* ou seus esporos, temperaturas estas alcançadas na autoclavagem. Complementa-se o processamento posteriormente, pela inspeção sanitária e tecnológica das latas, após a incubação.

Na fabricação de conservas de carne, além dos cuidados com o pH e atividade de água inferior a 0,94-0,93, é importante atentar para a necessidade de suficiente concentração dos ingredientes de cura, bem como para as temperaturas indicadas aos produtos cozidos.

Os produtos perecíveis mantidos sob refrigeração serão mantidos à temperatura inferior a 3,3°C, desde a fabricação, armazenagem e distribuição atacadista até seu consumo.

A higiene dos estabelecimentos industriais e de processamento é importante no sentido de que eles não sejam transformados em fontes de contaminação. É fundamental também que a rede varejista obedeça aos prazos de validade e às exigências de manutenção dos diferentes produtos, à Constancia das temperaturas prescritas e às condições de umidade e de higiene em geral.

Ao consumidor, recomenda-se, independentemente da adoção de cuidados quanto à procedência do alimento cárneo, pressionar para que o varejista obedeça às boas regras de manutenção dos produtos. Devem-se rejeitar os produtos envasados com sinais de fermentação por enlatados com bombeamento, não provando sequer qualquer alimento com mostras de deterioração. A mais leve suspeita deve ferver o alimento pelo menos por 15 minutos. Deve evitar ainda o consumo de alimentos crus ou pré-cozidos, que foram descongelados e mantidos à temperatura ambiente. Mesmo os produtos cozidos, mantidos em condições normais de meio ambiente, devem ser submetidos à nova cocção.

O risco potencial existirá sempre que forem introduzidas alterações na tecnologia de fabricação dos produtos sem uma avaliação criteriosa do impacto destas sobre o delicado equilíbrio entre a sobrevivência dos esporos do *Clostridium botulinum*, a depleção do nitrito e os níveis de outro parâmetro de cura. O risco será maior sempre que houver tendências a:

- a) utilizar-se menos nitrito e sal;
- b) distribuir desigualmente os sais de cura em produtos injetados, onde a meta de 3,5% de salmoura pode não ser alcançada;
- c) usar fosfato, que aumenta a capacidade de retenção de água da formulação e ao mesmo tempo aumenta o pH, diminuindo o efeito antimicrobiano do nitrito;

d) alterar a formulação do produto, reestruturar e utilizar carnes e ingredientes (especiarias, cereais, proteínas não cárneas, ascorbatos) que podem influenciar a efetividade do nitrito (GENIGEORGIS, 1986);

e) manter temperatura inadequada dos produtos depois de longa estocagem (TOMPKIN *et al*, 1980).

O botulismo é uma enfermidade de grande importância em toda a cadeia produtora de alimentos de origem animal, visto se tratar de doença de alta letalidade em homens e animais, acarretando graves prejuízos financeiros, e podendo levar grandes indústrias à falência por um único caso constatado. Deve ser de notificação obrigatória, e devem ser tomadas todas as medidas para o seu controle, desde a análise de solos, rações e águas em nível de campo, como também todos os cuidados de boas práticas de fabricação nas etapas do processo produtivo, envolvendo manipulação higiênica, água de boa qualidade na indústria, limpeza e sanificação eficientes, controle de pragas, instalações limpas, respeito às condições de tempo e temperatura em processo de tratamento térmico de alimentos envasados em recipientes inalteráveis e hermeticamente fechados capazes de destruir os esporos de *Clostridium botulinum*, e resfriamento, acondicionamento adequado, e expedição e comercialização dentro dos padrões higiênicos estabelecidos pela legislação brasileira, sendo adequadamente fiscalizados por técnicos da vigilância sanitária.

13 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O gênero *Staphylococcus* compreende cercas de 30 espécies, sendo rotineiramente dividida em dois grandes grupos: coagulase positiva e negativa. As espécies coagulase positivas (SCP) são reconhecidas como patógenos potencialmente sérios, devido a capacidade que esta enzima (coagulase) tem de coagular o plasma sanguíneo. As espécies que se destacam são *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus intermedius* e principalmente *Staphylococcus aureus*, por estar mais associada a doenças estafilocócicas e ser o de maior interesse em microbiologia dos alimentos (CUNHA NETO, 2002; ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000).

Em determinados países, a intoxicação alimentar por enterotoxinas elaboradas pelo *Staphylococcus aureus* é a mais freqüente. A agressão ao organismo do ingestor do alimento contaminado dá-se por causa da enterotoxina pré-formada e, portanto, dos fenômenos tóxicos que caracterizam a enfermidade.

O *Staphylococcus aureus* produz uma série de enzimas que podem contribuir para a sua patogenicidade, tais como a coagulase, catalase, desoxirribonuclease (DNase), lipase, termonuclease (TNase), bem como a toxina hemolítica, cuja produção está associada com a sua virulência. Seu alto poder de colonizar várias partes do corpo pode dar origem a infecções assintomáticas, facilitando assim a disseminação de várias doenças (SCHAECHTER et al, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2001; MARTH; HALPIN-DOHNALEK, 1990).

O envenenamento estafilocócico é uma intoxicação de origem alimentar, em razão do consumo de alimentos com exotoxina (enterotoxina), produzida por algumas linhagens de *Staphylococcus aureus*. Sob certas condições, entretanto, os sintomas desse tipo comum de envenenamento alimentar ocorrerão como resultado do crescimento de estafilococos no trato intestinal e, provavelmente, em outro lugar do corpo (CASMAN, 1967).

A ingestão de toxinas presentes no alimento, produzidas por cepas de *Staphylococcus aureus* e outras espécies, pode causar náusea, vômito, diarreia e câibras abdominais, sendo que as enterotoxinas são termoestáveis, não sendo necessariamente destruídas após o cozimento (SCHAECHTER et al, 2002; LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2001). Estudos evidenciaram ainda que a produção de enterotoxina não está restrita ao *Staphylococcus aureus*, sendo notada também entre outros SCP (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A atuação dos estafilococos como agentes causadores de envenenamento alimentar foi reconhecida primeiramente por Barber, em 1914. Entretanto, as descrições médicas de envenenamento, mesmo antes da descoberta do estafilococos por Koch, em 1878, e por Pasteur, em 1880, apontam aqueles microrganismos como responsáveis, há séculos, por envenenamento alimentar (DACK, 1956).

Em 1930, Dack *et al* (1956), isolaram o estafilococos do alimento responsável pelo envenenamento e reproduziram a doença, administrando o filtrado de cultura em voluntários humanos. Por essa razão, considera-se o ano de 1930 como o início da história moderna do envenenamento estafilocócico.

Produção de toxina/Modo de ação – São conhecidas cinco toxinas do *Staphylococcus aureus*, designadas pelas letras de A a E. É possível que existam outras, porém mais raras.

Há indicações de que os estafilococos produzem mais cinco enterotoxinas, substâncias termoláveis (destruídas em 30 minutos a 100°C), eméticas para os gatos segundo relato de Casman (1967), quando presentes em meio de cultura. Não se determinou ainda a função dessas substâncias na doença humana. A digestão pancreática do filtrado de culturas das linhagens – isoladas de espécimes clínicos, espécimes nasais, leite e alimentos congelados e não produtoras de enterotoxinas A, B, C ou D – foi testada em gatos por Casman (1967). Ele obteve, respectivamente, 30, 36, 27 e 24% de reações positivas, em face de substâncias eméticas diferentes daquelas enterotoxinas conhecidas.

A enterotoxina B é a que foi mais detalhadamente estudada. As enterotoxinas são diferenciáveis entre si em razão de seu comportamento imunobiológico. Anti-soros altamente específicos permitem determinar a formação de toxinas em estirpes de estafilococos isoladas de alimentos suspeitos.

A toxina A presomina em intoxicações alimentares. Grande número de epidemias devem-se à enterotoxina C e pouca à enterotoxina B. Estatísticas recentes mostram que a enterotoxina D também é responsável por grande quantidade de epidemias nos EUA. Em levantamento realizado a respeito de estafilococos isolados de 75 incidências diferentes de envenenamento alimentar. Casman (1967) constatou que, em 49%, produziu-se somente enterotoxina A; em 29%, produziu-se uma mistura de enterotoxina A com algum outro tipo, geralmente D; 10% de culturas produziram apenas a enterotoxina D; 4% produziram a enterotoxina B e 4% produziram a C.

Nem todas as estirpes coagulase-positivas causam intoxicações, fato que contraria hipótese inicial que relacionava a produção de toxinas à de coagulase.

Admite-se que os fatores concorrentes para a produção de toxinas são: a natureza do alimento, seu pH e a_w , a temperatura, o número de células do germe e as características de sua estirpe.

Frasier (1972) diz que as proteínas e o amido em abundância parecem estimular a produção de toxinas. Segundo o mesmo autor, alguns cocos toxígenos toleram muito bem o sal, crescendo em soluções de cloreto de sódio próximas da saturação, suportando relativamente bem os nitritos, razão pela qual crescem em carnes curadas ou em processo de cura, desde que as demais condições, como temperatura e outras relacionadas com o meio ambiente, lhes sejam favoráveis. São também muito tolerantes aos açúcares dissolvidos.

Em condições favoráveis, o microrganismo multiplica-se no alimento, inclusive em produtos cárneos, até alcançar cargas enormes, sem que sejam alterados significativamente a cor, o aroma e o sabor, a despeito de ser o germe fermentativo e proteolítico.

As temperaturas máximas que permitem o seu crescimento são de 44,4°C a 46,6°C, dependendo do tipo de alimento. O pH mínimo é de 4,8 em condições de aerobiose e de 5,5 em anaerobiose. A atividade de água mínima é de aproximadamente 0,86 sob aerobiose e de 0,90 em condições de anaerobiose. O tratamento térmico subletal diminui a tolerância ao sal. O processamento comercial, pelo calor, de carnes perecíveis, é suficiente para assegurar a destruição do estafilococo (GENIGEORGIS; RIEMANN, 1979).

A competição com outros tipos de bactérias nos alimentos pode reprimir ou retardar o crescimento de estafilococos e, conseqüentemente, a produção da toxina, podendo ainda ocorrer a alteração do alimento pelos outros microrganismos associados, diminuindo-se, com isso, o perigo do consumo. A contenção do crescimento depende do tipo e número dos organismos que competem, da natureza do alimento, da temperatura e do tempo de ação. Os estafilococos contaminam o alimento com pequeno contingente e, via de regra, são muito menos abundantes nos alimentos crus que as bactérias competidoras. Eles são maus competidores, contudo, nos alimentos tratados pelo calor; não se observa a competição, crescendo aí sem restrições.

Há uma relação estreita entre a quantidade de enterotoxina produzida e o número de estafilococos presentes, podendo esta quantidade não ser inferior a vários milhões por mililitro ou grama. O estímulo ao crescimento do microrganismo reflete-se na produção da endotoxina.

Parece que as temperaturas entre 15,6°C e 46,1°C proporcionam uma produção considerável de toxina, situando-se o ponto ótimo entre as temperaturas de 21,1°C e 36,1°C,

manifestando-se a produção entre quatro e seis horas, em condições favoráveis. Quanto menor a temperatura, maior é o tempo necessário para se produzir uma quantidade de toxina suficiente para causar a intoxicação. Há quem afirme, todavia, que não há produção anaeróbica de toxina a 30°C, acima de pH 5,3 ou abaixo de pH 5,56.

Outros autores dizem que o crescimento microbiano ocorreria à temperatura de 6,7°C, mas que a produção de endotoxina não é percebida a não ser a 16°C.

O tempo de incubação da doença varia entre uma e seis horas, com média de três, e depende da dose e da sensibilidade do indivíduo, caracteriza-se por vômito, náusea, cólicas abdominais de várias intensidades e diarreia. Nos casos graves, observa-se sangue e muco nas fezes e vômitos. Nos casos leves, há, frequentemente, vômito e náusea sem diarreia, como pode haver cólicas e diarreias sem vômito.

Prostração, dores de cabeça e suor intenso acompanham os casos graves. Segundo Elek (1959), envenenamento estafilocócico nas pessoas normais raramente é fatal, mas registra-se a fatalidade, ocasionalmente, em crianças e pessoas idosas. A mudança de temperatura é comum. Os pacientes geralmente se recuperam em período de 72 a 94 horas. A taxa de ataque varia entre 5 a 100%. O ponto primário de ataque está nos órgãos abdominais.

Nas alterações observadas na mucosa do jejuno, parecem originar-se estímulos aferentes que, através de fibras do vago e do simpático, atingem o centro do vômito. Sentem-se, ainda, os efeitos citotóxicos nas células dos grandes parenquimas, como fígado, pulmões e, especialmente, rins. O quadro hemático apresenta leucocitose, desvio à esquerda, aumento de catecolamina, glicose, nitrogênio residual, fibrinogênio do plasma e fósforo inorgânico. Diminuem as proteínas séricas, o cálcio, cloro, trombócitos e serotonina.

A toxina age também sobre o sistema nervoso central, porém sem maior gravidade.

Estudos recentes com toxinas purificadas revelaram uma similitude estreita entre a resposta do animal à enterotoxina e à endotoxina das bactérias gram-negativas.

13.1 Dose Infectante

Segundo referências de Nickerson; Sinskey (1985), Casman (1967) comprovaram que para haver intoxicação alimentar é necessária grande quantidade de estafilococos, calculando-se de 1 a 4µg de toxina estafilocócica do tipo A, para que surjam os sintomas. Demonstrou-se que os alimentos promotores da intoxicação estafilocócica apresentam contagem de 50×10^6 a 200×10^6 estafilococos por grama.

Outros estudos afirmam que menos de 1µg de enterotoxina A é suficiente para provocar os sintomas no homem. Em um surto de 1970, causado pelo consumo de manteiga, comprovou-se que é necessário muito pouca toxina do tipo A para produzir-se a enfermidade.

Em experiência realizada com voluntários, foi necessária uma dose entre 20 e 25µg de enterotoxina tipo B para provocar o vômito. Para a toxina A, a dose emetizante é de aproximadamente 1µg.

Bergdoll *et al* (1965) observaram que as enterotoxinas purificadas A, B e C mostram a mesma toxicidade em macacos. Trabalhando com voluntários, observaram ser a dose oral de 0,4µg/kg a mínima para provocar a ação da enterotoxina B.

Os mesmos autores avaliaram que menos de 1µg de enterotoxina A, em queijos consumidos por voluntários, causa a doença.

13.2 Difusão

O *Staphylococcus aureus*, germe ubíquo, difunde-se universalmente, sendo, em alguns países, o agente da intoxicação microbiana de maior incidência.

Em surtos de transtornos alimentares e enfermidades de origem alimentar ocorridos nos Estados Unidos em 1976, o número de surtos por estafilococos, do mesmo modo que a quantidade de pessoas enfermas se aproxima daquele produzido pela salmonelose. Noutros países, é possível que haja a mesma incidência ou que ela seja até mais grave.

Como fonte de infecção, considera-se que o homem é a mais importante fonte de *Staphylococcus aureus* para a contaminação dos alimentos.

O habitat principal desses microrganismos são as membranas mucosas nasofaríngeas. Elek (1959) mostra que o principal local de multiplicação são as narinas e a pele do homem e dos animais. Calcula-se que entre 30 w 50% das pessoas sadias sejam portadoras nasais. Esse percentual aumenta para 60-80% entre pacientes e pessoas hospitalizadas. Portadores assintomáticos que os apresentam na garganta somam de 4-7% nos EUA e na Inglaterra. Nos países escandinavos, eles estão entre 40 e 70%.

A pele apresentou de 4 a 44% dos casos e as mãos, de 14 a 40%. Portadores intestinais de estafilococos, em condição de pacientes recém-hospitalizados, atingiram índices de 17 a 100%.

Como mostram Genigeorgis; Sadler (1966) há indicações de que os estafilococos encontrados no homem e nos animais não sejam espécies únicas desse microrganismo, sendo possível o cruzamento entre espécies.

É fato conhecido a comprovação experimental que apontou cerca de 40% das pessoas adultas como portadoras desses organismos no nariz e na garganta, razão pela qual inclusive as pontas de seus dedos se encontram frequentemente contaminadas. Atriuuiu-se também a isto o fato de as saladas serem, habitualmente, fontes de intoxicação, em razão do costume de se prepará-la com as mãos. Neste particular, nos EUA, uma salada feita de frango desossado manualmente é tida como origem comum de surtos de intoxicações por toxina estafilocócica. O que ocorre com a salada de frango devido ao uso das mãos contaminadas, se aplica às demais saladas.

Outras fontes são os furúnculos, as feridas e mesmo pequenas erosões da pele com aspecto supurativo. A bactéria aloja-se ainda na garganta, olhos e intestinos. Além disso, quase todos os animais domésticos hospedam o microrganismo. Somente em determinadas condições, o ar é considerado fonte importante de estafilococos.

Entre os animais domésticos, chama-se a atenção para determinadas formas de mastite das vacas e para o fato de que alguns destes cocos sejam capazes de produzir endotoxinas no leite e produtos lácteos, ainda que não frequentemente. O cuidado com as vacas com mastite no momento da esfolagem e da inspeção *post mortem* na sala da matança, é de suma importância a fim de se prevenirem possíveis contaminações.

13.3 Alimentos Implicados

A maioria dos alimentos, principalmente os de origem animal, como o leite e produtos derivados estão sujeitos à contaminação por microrganismos capazes de produzir alguma doença no ser humano tais como, tuberculose, brucelose é outro tipo de infecção. Isto pode ocorrer devido a uma deficiência na higiene durante o processo de obtenção, manipulação, fabricação e conservação dos mesmos. Assim, o queijo assume destacada relevância, já que se trata de um produto derivado do leite e, principalmente, quando fabricado a partir de leite não pasteurizado, podendo sofrer algum tipo de contaminação por bactérias patogênicas e enterotoxigênicas (ALMEIDA; NADER, 2000; ISEPON *et al*, 2003).

Partindo das premissas básicas de contaminação do alimento com o microrganismo e da multiplicação deste, passa-se à formação de concentrações perigosas de toxina para o

homem, quando a multiplicação bacteriana alcança níveis superiores a $10^6/g$, condição que depende do meio. Para esse efeito, exercem condições favoráveis alimentos que contenham altos teores de proteína e água, sob temperaturas médias e quentes. Também a alta concentração de amido é tida como favorável (FRAZIER, 1993). A formação de toxina é viável na faixa de $6,7^{\circ}C$ a $45,5^{\circ}C$, afirmando alguns que a produção de toxinas passa a ser considerável aos $16^{\circ}C$. Com atividade de água em torno de 0,86 e pH entre 6,5 e 7,3, produzem-se condições ótimas para o crescimento da bactéria e produção de toxinas.

É desfavorável o nível de a_w em 0,89. Alguns experimentos mostraram que até em pH 4,0 houve produção de toxinas, ainda que outros o contradigam. Na presença de bastante oxigênio, o sal, nas usuais concentrações de cura, é dado como capaz de inibir a formação de toxina. Uma vez formada a toxina, resiste ela a altas temperaturas, contrastando com a menor resistência da forma vegetativa. Baixas temperaturas desfavorecem o crescimento bacteriano e a conseqüente formação da toxina.

Entre os alimentos mais particularmente implicados em surto ou casos de intoxicação por estafilococos, contam-se: pratos preparados à base de carne, pastéis, presunto cozido, leite e produtor lácteos, derivados de ovos e todos os alimentos preparados com esses produtos, tais como saladas, cremes, recheios de pastéis, gelados e pastas. São também incluídas conservas de carne em gelatina, molho e sucos de carne, carne de aves e língua.

A mastite é a principal doença que afeta o gado leiteiro, sendo responsável não só por prejuízos econômicos ao produtor, como também por colocar em risco a saúde da população que consome o leite e seus derivados quando contaminado (BRITO *et al*, 2003; FENIMAN *et al*, 2003). O *Staphylococcus aureus* é um dos principais causadores dessa enfermidade no mundo. De acordo com levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, este microrganismo está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos de leite (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Outras espécies de *Staphylococcus* têm sido isoladas de leite de cabra e ovelha, bem como de leite de bovino, no qual podem ser encontradas cerca de 15 espécies pertencentes a este gênero, como o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, entre outros (CUNHA NETO, 1999; NICKERSON, 1995).

Um queijo, freqüentemente produzido em nosso país e que faz parte do hábito alimentar da maioria da população, é o Minas Frescal, obtido pela coagulação enzimática do leite com coalho, podendo ou não ser complementada com a ação de bactérias lácticas específicas. Por ser fabricado em grande escala e de forma artesanal, não há, na maioria das

vezes, uma higiene adequada por parte do manipulador, e um tratamento adequado ao leite. Sendo assim, este produto é um dos grandes responsáveis por intoxicações alimentares (FRANCO; LANDGRAF, 2001).

O queijo Minas Frescal é considerado um queijo de alta umidade (46 a 55%), tolerando um número mais provável (NMP) de 10^3 a 5×10^2 UFC/g para *Staphylococcus aureus* (Resolução – RDC n° 12 e 2 de janeiro de 2001/ ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Seu padrão organoléptico deve obedecer a características tais com, coloração interna esbranquiçada, consistência mole e sabor variando de levemente ácido à suave (ALVES, 2001; ISEPON *et al*, 2003). Sablé *et al* (1997), em estudos com queijos fabricados a partir de leite cru de cabras, verificaram que a produção de lípases e proteases por *Staphylococcus* e *Micrococcus* ocasionaram algumas modificações organolépticas (textura e sabor) nas amostras deste tipo de queijo. Assim, torna-se importante a análise destas enzimas em microrganismos detectados em alimentos.

A contaminação de alimentos pode ocasionar problemas de Saúde pública, acarretar prejuízos financeiros, causar danos nas suas características químicas, físicas e organolépticas além de diminuir sua vida de prateleira. Assim, fazem-se necessárias análises microbiológicas dos alimentos, a fim de avaliar suas condições higiênico-sanitárias através de seus aspectos microbiológicos (LEITÃO *et al*, 2002).

Em pesquisas realizadas em âmbito nacional e internacional, a espécie coagulase positiva comumente encontrada são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* (SÁ *et al*, 2000; ROBERSON *et al*, 1996; FREITAS; MAGALHÃES, 1990).

Isto se justifica pelo fato de em muitas fazendas ou locais onde há produção de leite e/ou fabricação de queijos, não haver nenhuma medida de desinfecção dos tetos, rotineiramente padronizadas, antes ou após ordenha e nem uma assepsia adequada das mãos do ordenhador, o que pode facilitar a transmissão de microrganismos de um animal a outro. Por isso, a saúde do animal é de fundamental importância, principalmente quando se trata de doenças como a mastite (BRITO *et al*, 2000).

Muitos estudos têm demonstrado uma crescente preocupação de se avaliar as condições higiênico-sanitárias de produtos alimentícios, bem como avaliar seus aspectos microbiológicos, visto que muitas espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir alguns tipos de enzimas que podem contribuir para a sua virulência, tais como: catalase, coagulase, Dnase, lípase, penicilinase, protease e termonuclease (ASSUMPCÃO *et al*, 2003;

FORSYTHE, 2002; GONZALES *et al*, 1997; NISENGARD; NEWMAN, 1997; OTERO *et al*, 1987).

Autores têm investigado a produção de Desoxirribonuclease (Dnase) por cepas de *Staphylococcus*, isolados de leite, queijo e outros produtos alimentícios, verificando que um grande número de cepas de *Staphylococcus aureus* são produtoras desta enzima (VIEIRA-DA-MOTA *et al*, 2001). Nesta pesquisa verificou-se que *Staphylococcus aureus* foi a espécie que apresentou um maior percentual para a produção desta enzima (39,2%), e as que permanecem como *Staphylococcus* coagulase positivas – SCP (20,3%). Segundo Nisengard; Newman (1997) a Dnase é uma enzima dos *Staphylococcus* utilizada como um indicador de patogenicidade em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de animais e de origem humana.

Bactérias pertencentes a este gênero são capazes de produzir pelo menos quatro tipos diferentes de hemolisinas, sendo as principais β , α e γ . Observou-se que o *Staphylococcus aureus* foi a espécie que apresentou maiores percentuais de produção das toxinas hemolíticas estudadas (α , β e γ), seguido das espécies que permaneceram como coagulase positivas. Com exceção do *Staphylococcus chromogenes*, todas as outras espécies produziram a β -hemólise, sendo esta a mais frequente. Neste estudo, as únicas espécies que não produziram protease foram o *Staphylococcus hyicus* e os SCP. Dentre as espécies produtoras desta enzima, o *Staphylococcus aureus* teve o maior percentual (50%).

Cáceres; Pizarro (1997), analisando amostras do queijo Casar de Cáceres, observaram que das seis cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas, cinco foram consideradas hemolíticas, juntamente com uma espécie de *Staphylococcus intermedius*.

Em certos casos, a produção desta enzima está relacionada com a produção de enterotoxinas, o que confere uma maior virulência ao patógeno (PEREIRA *et al*, 1995). Harshman *et al* (1992) citam que esta pode ser responsável por necrose de tecidos, disfunções cardíacas e isquemias. A produção de biofilmes por cepas de *Staphylococcus* spp. também pode estar relacionada com a produção de hemolisinas. Sabe-se que os biofilmes conferem a estes microrganismos uma maior resistência a antimicrobianos.

Lípases e proteases são frequentemente encontradas em *Staphylococcus* envolvidos em infecções como carbúnculos e furúnculos, no caso das lípases e alguns tipos de doenças de pele, como dermatite atópica no caso das proteases. A produção destas enzimas em grande quantidade está associada ao aumento da virulência do *Staphylococcus aureus* principalmente (MARTH; HALPIN-DOHNALEK; 1990).

Enzimas proteolíticas e lipolíticas podem ser uma das maiores causas na deterioração de alimentos, já que as lípases bacterianas sobrevivem a temperaturas de pasteurização, e no caso de queijos as ações destas enzimas podem ocasionar modificações em seus padrões organolépticos (BRAUN *et al*, 1999; SABLÉ *et al*, 1997). Por outro lado, estudos demonstram que a lipase pode ter aplicação industrial, justamente para melhorar algumas características dos alimentos tais como textura, sabor e odor. Todas as espécies analisadas apresentam atividades lipolíticas, sendo o *Staphylococcus aureus* o que obteve um maior percentual para a produção desta enzima (51,8%). Este resultado está em concordância com Braun *et al* (1999), que analisando a atividade lipolítica de diferentes espécies de microrganismos, observaram que dentre as espécies estudadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*) a que obteve maiores percentuais foi *Staphylococcus aureus*, com 51,8%.

Braun *et al*, (1999), constataram a presença de lípase não só em cepas de *Staphylococcus aureus* mas também em *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus hyicus*.

Muitos pesquisadores da área de análise microbiológica de alimentos têm voltado suas atenções para a produção desta enzima por certas espécies de microrganismos, principalmente os pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, pois muitos estudos demonstram uma relação entre a produção de diversas enzimas, tais como a coagulase, hemolisina e principalmente TNase, já que a ingestão de toxinas presentes no alimento pode ser responsável por intoxicações alimentares (VIEIRA-DA-MOTA, 2001; RAYMAN *et al*, 1975).

Foi constatado um índice de 50%, de produção de TNase pelas cepas de *Staphylococcus aureus*. Pereira *et al* (1991) em pesquisas com alimentos envolvidos em intoxicação alimentar e com cepas isoladas de queijo minas frescal, respectivamente, verificaram a relação entre produção de enterotoxina e de termonuclease.

Jasper *et al* (1985) verificaram que 99,5% dos *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite produziram TNase. Freitas; Magalhães (1990) encontraram um índice de 91,4% de cepas deste patógeno são produtoras desta enzima, em amostras de leite pasteurizado tipo C. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al* (2000) que, analisando cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico, constataram que 97,8% eram produtoras de Termonuclease.

Outros estudos detectaram a presença não só de *Staphylococcus aureus*, como também de outras espécies pertencentes a este gênero, produtoras desta enzima (CUNHA NETO *et al*, 2002; SILVA *et al*, 2000). Neste estudo, além do *Staphylococcus aureus*, as espécies *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* e as que permaneceram como SCP, também foram produtoras de termonuclease.

Estes dados são preocupantes, tanto em saúde pública quanto em medicina veterinária, uma vez que o leite, estando contaminado por microrganismos produtores de enzimas termoestáveis, coloca em risco a saúde dos consumidores de produtos lácteos, além de conferir uma maior capacidade dos patógenos em causarem danos à saúde do animal (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; BRITO, 2000).

O *Staphylococcus aureus* e outros *Staphylococcus* coagulase positiva, são os microrganismos mais envolvidos em infecções e intoxicações, sendo na maioria das vezes detectados no leite cru. Assim, é de suma importância averiguar a origem primária destas cepas, pois este tipo de informação serve como subsidio ao conhecimento da epidemiologia bem como auxilio no controle da doença (BRITO *et al*, 2000).

Pesquisadores brasileiros realizando a biotipagem da origem do *Staphylococcus aureus* isolados de leite com mastite nas regiões sul, sudeste e nordeste, verificaram a presença de cepas de biótipos bovinos, humano, aviário e ovino, com predomínio de ecovares bovinos (BRITO *et al*, 2000). Essa elevada ocorrência de ecovares bovinos também foi apresentada pelas cepas analisadas neste estudo. Diferindo dos dados acima citados, detectamos também biótipo canino.

Este número de biótipo canino nas amostras de queijo poderia ser atribuído a falhas durante o processo de ordenha ou beneficiamento do leite, como, por exemplo uma má higienização por parte do manipulador, ou mesmo pela presença de cães, seja no local da ordenha ou no local de fabricação do queijo.

Pode-se inferir que vários fatores são responsáveis para que ocorra a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos, tais como manipulação inadequada das matérias-primas, má sanitização dos equipamentos utilizados e emprego de embalagens que não assegurem a qualidade do produto (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000).

Desta forma, é necessária a análise microbiológica dos alimentos, principalmente aqueles que são intensamente manipulados, pois os danos causados a estes implicam tanto em

prejuízo financeiro ao produtor como em risco à saúde das pessoas que consomem estes alimentos contaminados.

Os fatores básicos que levam à contaminação foram a composição química do alimento, pH, presença de outras bactérias no alimento, atmosfera, temperatura, métodos de produção, distribuição e consumo, sendo os três últimos determinantes, até certo ponto, do grau de contaminação do alimento por manipuladores ou pelo ambiente.

Como mostra Bryan (1976), embora a maioria dos surtos deva-se ao manuseio de alimento pelo pessoal que prepara as refeições na indústria, não é incomum a contaminação de carnes processadas, manuseadas pelo pessoal da fábrica. Dados epidemiológicos revelam, de acordo com o mesmo autor, que resfriamento impróprio, alimentos preparados um dia ou mais antes de serem consumidos e alimentos cozidos, manipulados por pessoas infectadas, são os fatores que mais contribuem para o aparecimento de surtos de envenenamento estafilocócico.

A prevalência de *Staphylococcus aureus* em carnes cruas é alta (GENIGEORGIS, 1978). Os níveis são encontrados comumente abaixo de 500 CFU/g. Porém, ocasionalmente podem ser tão altos quanto 70.000 CFU/g. durante a fermentação do salame, o crescimento dos estafilococos precisa ser detido. Os parâmetros que afetam a probabilidade de crescimento de estafilococos ou outros patógenos como *Salmonella* e *C. botulium* durante a fermentação. Diz-se então que:

a) A probabilidade de crescimento de estafilococos amplia-se com o aumento dos níveis iniciais de *Staphylococcus aureus* (METAXOPOULOS *et al* (1981). Deve-se dar preferência às carnes e cortes de contagem estafilocócica baixa;

b) O pH inicial mais alto de carne aumentará o crescimento de estafilococos e um pH Máximo *standart* (preferivelmente abaixo de 6,0), para carnes compradas, deve ser adotado pelos processadores. De acordo com o mesmo autor, leve acidulação inicial de misturas de carnes com GDL (gluconato-delta-lactona), por exemplo, diminuirá sensivelmente o potencial de crescimento estafilocócico, aumentando a segurança contra a contaminação;

c) O uso de *starters* puros de bactérias ácido-lácticas é necessário para assegurar o grau máximo de inibição de patógenos. Alguns *starters* comerciais não serão capazes de crescer em algumas formulações de salames e, segundo Genigeorgis (1978), é necessário encontrar *starters* mais adequados;

d) Carboidrato suficiente deve ser adicionado para assegurar efetivo crescimento de *starters* e inibição de patógenos.

Estas orientações para a produção de embutidos fermentados secos e semi-secos devem ser seguidas por cada fabricante.

Em muitos surtos estafilocócicos originários da carne, os fatores que mais predispõem à contaminação vêm da inadequada manipulação dos produtos, resultando em contaminação cruzada (manipuladores de alimentos, alimento cru e alimento contaminado) e na exposição dos produtos a temperaturas adequadas ao crescimento. Assim, como mostram Genigeorgis; Riemann (1979), presuntos pasteurizados e auto-estáveis, contaminados durante o fatiamento e posterior manipulação, são substratos seletivos excelentes para o crescimento de estafilococos, na presença de NaCl e na ausência de competição microbiana significativa.

A principal razão pela qual os presuntos são tidos como freqüente causa de contaminação deve ser debitada também ao fato de serem eles quase sempre preparados em grandes quantidades e guardados em pilhas, em número elevado, sob temperatura ambiente ou de refrigeração.

É fato bastante conhecido nos meios científicos a grande resistência da toxina às altas temperaturas, podendo esta formar-se previamente em determinados produtos, resistindo em seguida à dessecação. Constitui exemplo bastante citado o de uma partida de leite em pó enviada pelos Estados Unidos à Costa Rica, que causou um surto tóxico, atingindo 1.500 indivíduos. Submetido o produto à análise, não foram detectados nele estafilococos viáveis, mas sim toxina. As condições tempo e temperatura não foram suficientes para inibir a toxina, ainda que o fossem para destruir as bactérias.

Os estafilococos são muito pouco afetados pelos níveis de ingredientes de cura e pH de muitos produtos cárneos processados sob condições anaeróbias. Entretanto, como descrevem Genigeorgis; Riemann (1979), esses níveis podem tornar-se inibidores sob condições aeróbicas, tal como o empacotamento a vácuo.

Quando pouco curado ou curado às pressas, amaciado ou pré-cozido, o presunto é produto alterável se não for mantido a baixas temperaturas, guardando a possibilidade de sediar a multiplicação bacteriana.

Por vezes, mesmo alimentos muito ácidos e, portanto, impróprios ao desenvolvimento dos estafilococos, quando somados a outros alimentos como ovos, creme, etc., que reduzem a acidez do meio, podem converter-se em fontes de intoxicação.

Nickerson; Sinskey (1985) contrariam a tão prestigiada hipótese, segundo a qual há uma grande proliferação do *Staphylococcus aureus* tanto na maionese comercial quanto na caseira, argumentando que o seu pH nunca é superior a 4,0 e num meio com este pH o

estafilococo não cresceria. Comprovou-se ainda que estirpes estafilocócias produtoras de toxina tipo B não se multiplicam na maionese. Contudo, quando à maionese foram adicionados outros alimentos, como frango, o presunto ou batatas, o pH da mistura ficou muito mais elevado que o dela sozinha, tornando-se então o alimento um meio adequando à proliferação microbiana.

A literatura especializada descreve a chamada contaminação *post process* ou cruzada, segundo a qual alguns produtos, depois de processados, têm sua flora destruída pelo calor, sofrendo a contaminação estafilocócica que, na ausência ou mera redução da flora competitiva, se desenvolve sem obstáculos, atingindo, rapidamente, desde que as demais condições o favoreçam, o ponto crítico de formação de toxina.

13.4 Resistência

De início, resalte-se o contraste entre a menor resistência da forma bacilar e a tenacidade da toxina à ação do calor.

Quanto às células do *Staphylococcus aureus*, Nickerson; Sinskey (1985) relatam interessantes experiências, que trabalharam diretamente com os alimentos como o frango à *king*, recheio de creme e salada de presunto. A experiência demonstrou que o estafilococo cresce melhor no recheio de creme, a 35°C, alcançando concentrações celulares um pouco mais elevadas. A 6,7°C, desenvolvem-se melhor no frango à *king* que nos demais. Em temperaturas mais elevadas, como acontece ao cozinhar, ou nos primeiros momentos da preparação culinária, comprovou-se que há ligeira proliferação na salada de presunto a 44,4°C, enquanto que no frango à *king*, a esta mesma temperatura, desenvolvem-se quantidades comparativamente superiores e, inclusive, até concentrações celulares mais elevadas que no creme de recheio. A 45,5°C, diminui-se o número de *Staphylococcus aureus* no frango à *king*, mas aumenta bastante no creme de recheio. A 46,6°C, a contagem de células permanece constante por certo tempo, para diminuir, em seguida, lentamente.

Durante a cocção de recheio de perus de grande porte, inoculados com *Staphylococcus aureus*, o número de células somente começou a decair no recheio à temperatura de 48,9°C, e, em alguns casos, quando alcançou 57,2°C.

Diante de tais resultados, consideram-se insuficientes as duas temperaturas para os respectivos casos testados. Assim, devem ser programados níveis mais elevados de temperatura, quando se pretende a destruição das células do *Staphylococcus aureus*.

Frazier (1993) admite a relativa termorresistência, afirmando que nem sempre a pasteurização destrói os estafilococos. Assinala que é possível aniquilar um milhão de estafilococos por mililitro ou grama de alimento, à temperatura de 66°C, por pelo menos 12 minutos, ou a 60°C, durante um período de 78 s 86 minutos. Afirma ainda que a resistência ao calor varia com o tipo de alimento e com a estirpe de *Staphylococcus*. Na aplicação dos raios gama em alimentos úmidos, uma dose entre 0,37 e 0,48 Mrad destrói a maioria dos estafilococos.

É necessária uma dose de 5 Mrad para reduzir a enterotoxina B da concentração de 31 mg/mL a menos de 0,5 µg/mL, no leite. Com o tampão de veronal e o leite como veículo, o valor D (dose requerida para inativar 90%) para a inativação da enterotoxina B foi entre 2,7 e 9,7 Mrad respectivamente.

Quanto à resistência, a enterotoxina, segundo Frazier (1993), é consideravelmente termoestável, resistindo à ebulição por um período de 20 a 60 minutos, bem como ao tratamento em autoclave, ainda que perca gradualmente sua potência. Conclui este autor que, nestas condições, os tratamentos térmicos dados aos alimentos antes do consumo são insuficientes para destruir a toxina pré-formada, não se evitando dessa forma a intoxicação, apesar de não ficar demonstrada a presença de células viáveis.

A toxina B é mais resistente ao calor que a toxina A. em experiências, demonstrou-se que a enterotoxina B manteve suas propriedades biológicas em seguida ao aquecimento, por 16 horas, a 60°C e em meio com pH 7,3. Outra pesquisa testou a enterotoxina A, que perdeu sua capacidade de reagir sorologicamente sob aquecimento de 80°C por três minutos ou de 100°C por um minuto.

O tempo de redução decimal (90% da destruição) da enterotoxina B, no tampão veronal (0,01 M pH 7,2), para as temperaturas de 210°F (98,4°C), 230°F (110°C) e 250°F (121,1°C), foi de 52,3 de 23,5 e de 9,9 minutos (valores D), respectivamente, para a toxina purificada.

Um decréscimo de 50% na reação da enterotoxina com seu anticorpo específico (determinada pela difusão simples) resultou numa solução contendo 0,2 mg de enterotoxina A/ml de tampão de 0,05 M de fosfato pH 6,85, quando aquecida a 60°C, por 20 minutos. O aquecimento do mesmo material por três minutos a 70°C decresceu 60% na reação antígeno-anticorpo. Nenhuma reação ocorreu após aquecimento da toxina a 80°C e 100°C, por três e um minutos, respectivamente. A toxina é resistente à tripsina. O valor Z da enterotoxina A, na água destilada, é 48°F (26,6°C) com valor D a 250°F (121,1°C) de 11 minutos ($F^{48}250=11$).

A inativação da enterotoxina bruta, em tampão de veronal (pH 7,2), baseada no teste sorológico, resultou em um valor Z de 27,8°C (50°F). a resistência a 250°F (121,1°C) foi de 22 minutos ($F^{50}_{250}=22$ minutos).

Em razão da resistência das enterotoxinas à pasteurização e às temperaturas de cocção aplicadas no âmbito da culinária, indica-se a esterilização a 117°C para inativá-las com mais segurança.

Frazier (1993) relatou a factibilidade da destruição das células estafilocócicas a 66°C por 12 minutos, afirmando que, para se destruir a enterotoxina, é necessário tratamento drástico como, por exemplo, a autoclavagem a 121°C, durante 30 minutos.

A toxina não inteiramente inativada pode, embora parcialmente, reconstituir-se nos alimentos mantidos a 25°C, por 24 horas.

Segundo Santiago (1972), as enterotoxinas são resistentes às enzimas proteolíticas, tais como: tripsina, quimiotripsina, renina e papaína com pH em torno de 2,0.

Santiago (1972), demonstrou que o cloreto de sódio em concentrações de 2 a 3% inibe a enterotoxina, enquanto o nitrito e nitrato não surtem qualquer efeito na sua produção. Estas conclusões são coerentes com as afirmações de Frazier (1993) no que se refere ao nitrato e nitrito, mas contraditórias com o comportamento do estafilococo em relação ao sal. Enfatiza aquele autor a extrema tolerância dos estafilococos a elevadas concentrações de sal, a ponto de, mesmo na presença de nitrato, nitrito e sal, haver possibilidade de o microrganismo crescer em carnes curadas, se as demais condições favorecem.

Algumas observações envolvem as normais concentrações de sal e demais ingredientes de cura na indústria, apontando para a inibição da formação de toxina, o que ocorre com um aporte abundante de oxigênio. Na ausência de oxigênio, houve a suspensão da formação de toxina, ainda que os microrganismos continuassem a se desenvolver de modo limitado.

13.5 Prevenção

A presença de estafilococos coagulase positiva nos alimentos, ocorre principalmente pela manipulação inadequada destes, através de práticas não higiênicas e/ou contaminação cruzada; ou exposição a temperaturas abusivas. Para se delinear um plano de controle da intoxicação estafilocócica, deve-se partir da premissa que é fundamental evitar a

contaminação, impedir o crescimento do microrganismo e destruir os estafilococos existentes nos alimentos.

Pode-se evitar ou reduzir a contaminação, com a adoção de medidas gerais de higiene como a do ambiente nos estabelecimentos industriais, a do equipamento e instrumentais em geral, a do pessoal e a do transporte no recinto da indústria evitando-se os maus hábitos e a ocorrência de resfriados, feridas e outras fontes de microrganismos. Devem ser tomados cuidados especiais, inclusive com o pessoal sadio, quanto à higiene das mãos que deverá ser rotineira, como, aliás, acontece nas indústrias sob inspeção federal. Este procedimento é plenamente justificável, ao se reconhecer o homem como principal veículo de contaminação do *Staphylococcus aureus*. A automatização do processamento de alimentos, reduzindo-se ao mínimo o manuseio, é uma prática recomendável. Verifica-se, numa repetição monótona, que os cuidados higiênicos são os mesmos apontados para a prevenção das demais intoxicações microbianas. São, efetivamente, normas imutáveis e de uso generalizado.

A fim de prevenir contra o estafilococo pode ser indicado ainda a pasteurização dos produtos que comportam esta prática e o uso sistemático da refrigeração para aqueles sujeitos às contaminações. A ausência total de estafilococos, ou baixa contagem nos alimentos, desde que se adotem cuidados preventivos em geral, não permitirá contaminações em níveis alarmantes quanto à formação de toxinas, além de levar as fatais contaminações pelos germes concorrentes a inibir ainda mais seu crescimento.

Ademais, deve-se evitar a todo o custo a contaminação cruzada. Por paradoxal que seja, em ambientes irrepreensivelmente limpos, desde que haja contaminação e condições favoráveis, o estafilococo se multiplica rapidamente, em virtude da falta de competidores.

Se a contaminação de alimentos por outros alimentos for muito difícil de evitar, a melhor providência é inibir a multiplicação dos estafilococos, tarefa que hoje em dia pode ser conseguida com o uso de temperaturas baixas (5,4°C) durante a produção, distribuição e venda dos alimentos. A combinação de temperatura baixa e embalagem a vácuo é um método excelente de prolongamento do tempo em que o produto pode permanecer nas prateleiras, em virtude da inibição do crescimento da flora aeróbica. A temperatura, nesse caso, deverá sempre ser mantida em nível baixo, já que os estafilococos crescem e produzem enterotoxinas anaerobicamente. A adoção de pH baixo (4,8) para controlar a produção de enterotoxina é possível, mas deve-se levar em conta a mudança de sabor e aroma, bem como a reação do consumidor. O mesmo se aplica ao uso de NaCl. A tendência corrente para a redução da dieta de sódio traz uma demanda maior aos produtos cárneos processados com menos NaCl. As

implicações da diminuição do uso de NaCl não têm sido extensivamente avaliadas. Em carnes fermentadas, por exemplo, menos NaCl tornará a formulação menos seletiva para o *Staphylococcus aureus*, porém mais condizente para a bactéria *starter* e outras bactérias da carne.

O uso de antibióticos resulta na seleção de linhagens de estafilococo resistentes e na eliminação do efeito competitivo da microflora dos alimentos. Estuda-se o uso de substâncias químicas e/ou de espécies competidoras encontradas naturalmente no alimento. O uso de radiações ionizantes também tem sido estudado. A liofilização de alimentos é um excelente método de prevenção contra estafilococos inicialmente presentes. A penicilinase, enzima que se liga a penicilina, dançando à célula bacteriana a resistência a este antimicrobiano, tem causado grandes preocupações a médicos e pesquisadores. A resistência de *Staphylococcus aureus* à penicilina propagou-se entre os hospitais, tendo se tornado assim um grande problema do ponto de vista clínico e econômico, já que bactérias resistentes a este antibiótico são combatidas com a vancomicina, um antibiótico de administração difícil e custo elevado (NISENGARD; NEWMAN, 1994).

Estudos a respeito desta enzima são de extrema importância, visto a resistência que *Staphylococcus aureus* e outras espécies deste gênero têm à penicilina (LIMA *et al*, 1999). Segundo Schaechter *et al* (2002) em 1992 verificou-se uma porcentagem de 32% de cepas de *Staphylococcus aureus* e 75% de *Staphylococcus epidermidis*, em hospitais dos Estados Unidos, resistentes a este antibiótico.

A resistência à penicilina pode ser devido ao uso indiscriminado deste antibiótico, utilizado também em muitas fazendas produtoras de leite, seja para o tratamento da mastite como para suplementação dietética dos animais. Existe a possibilidade de que os antimicrobianos utilizados em animais de produção possam selecionar cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidos ao homem pela ingestão de produtos de origem animal. Portanto, a presença de microrganismos resistentes a antibióticos em produtos lácteos representa um risco à saúde pública principalmente no nicho de mercado de produtos comercializados sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial. A Termonuclease (TNase) é uma enzima produzida por 99% dos SCP, sendo usada como indicador para a detecção de *Staphylococcus aureus* em alimentos (visto que a maioria das cepas patogênicas produz a TNase) (NISENGARD; NEWMAN, 1997).

14 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

As intoxicações microbianas provocadas pelo *Clostridium perfringens* vêm recebendo nos últimos anos maiores atenções. Possivelmente, a elevada incidência se deva mais aos progressos dos métodos anaeróbios utilizados para sua detecção.

Era ela considerada uma infecção alimentar pelo fato de que filtrados estéreis de elementos nutritivos, nos quais havia crescido o *Clostridium perfringens*, não causavam a enfermidade, ao passo que era observada em voluntários que haviam ingerido culturas de microrganismos isolados de surtos da doença.

Na década de 40, quando ainda chamado *Clostridium welchii*, o *Clostridium perfringens* era empregado na determinação da poluição hídrica, devido à sua capacidade esporogênica e resistência dos esporos. Ocorria regularmente nas fezes, no esterco e no esgoto, sendo carregado para as águas nas mesmas condições que os organismos coliformes, em razão de possuírem maior resistência que estes, indicando poluição remota, mesmo na ausência dos organismos coliformes. Ainda que sua detecção não fosse uma prática rotineira, ela era usada como indicador de poluição intermitente ou valia como corroboração dos demais testes. Naquela altura, a despeito de alguns trabalhos sobre casos de intoxicação alimentar com a participação do *Clostridium*, sua interferência em surtos, na Inglaterra e País de Gales, é que levaram à sua perfeita caracterização como agente toxigênico (HOBBS, 1999).

14.1 Microrganismo

Clostridium perfringens é um organismo de forma bacilar, imóvel, esporulado, gram-positivo, anaeróbio. Segundo Hobbs (1999), crê-se que dos cinco tipos (A, B, C, D e E) de *Clostridium perfringens* conhecidos, classificados de acordo com a toxina produzida, somente dois deles, o A e o C, são capazes de causar enfermidade de origem alimentar no homem. O tipo A é o mais encontrado como causa das intoxicações alimentares, incluindo-se também entre os tipos patogênicos responsáveis pela “gangrena gasosa”. O tipo C causa enfermidade mais grave, denominada enterite necrótica. As estirpes do tipo A são divididas em diversos sorotipos pelo emprego de anti-soros específicos. Cada tipo pode produzir de uma a seis, senão mais, das doze principais toxinas próprias deste grupo de microrganismos.

Serrano (1976), ao descrever as propriedades do *Clostridium perfringens*, relata que os trabalhos iniciais mencionavam apenas estirpes não hemolíticas que podiam, após alguns dias, mostrar pálida hemólise em sangue de cavalo. Depois de comprovado que algumas estirpes termoláveis também eram responsáveis pela doença, realizou-se uma revisão e o tipo A foi dividido em:

- 1) Estirpes clássicas, hemolíticas beta em ágar-sangue de cavalo, formando esporos, raramente resistentes a 100°C, por mais de dez minutos;
- 2) Estirpes não hemolíticas, resistentes a 100°C por mais de uma hora, quando em caldo de carne cozida, produzindo apenas traços de lecitinase;
- 3) Estirpes sensíveis ao calor, não hemolíticas, produzindo quantidades variáveis de lecitinase. Mas há também casos de sobreposição entre as três categorias, bem como o registro de algumas exceções.

Do mesmo modo, os efeitos hemolíticos em ágar-sangue não são perfeitamente consistentes, podendo variar quando varia o meio de crescimento. O comportamento polimorfo desde gênero torna o estudo mais difícil.

Em geral, as estirpes isoladas em surtos de intoxicação alimentares na Grã-Bretanha mostram-se resistentes ao aquecimento a 100°C. Com aquecimento a esta temperatura por dez minutos, promove-se a destruição de quase 100% dos esporos. Já as estirpes isoladas de surtos ocorridos nos Estados Unidos são diferentes, parecendo significar que qualquer uma do tipo A pode causar intoxicação alimentar, independente de sua termorresistência.

De acordo com Frazier (1993), a resistência ao calor das diversas estirpes responsáveis por intoxicações é muito variável, requerendo a destruição de muitas delas de uma a quatro horas, a 100°C, enquanto outras são destruídas em poucos minutos.

Segundo Frazier (1993), a temperatura ótima para o crescimento do *Clostridium perfringens* varia de 43 a 47°C, até a temperatura máxima de aproximadamente 50°C, com crescimento muito escasso entre 15 e 20°C. Serrano (1976) considera favorável ao crescimento do *Clostridium perfringens* a faixa de temperatura compreendida entre 30 e 48°C.

Estes microrganismos também apresenta variações no que se refere ao pH. Assim, enquanto Frazier (1993) afirma que ele não cresce com pH inferior a 5 ou superior a 9, há experimentos demonstrando que, em três estirpes estudadas, uma delas conseguiu crescer em pH 4,4 à temperatura de 30°C. Outros experimentos com quatro estirpes de *Clostridium*

perfringens mostraram que não houve crescimento em pH 5,0 e 8,5, mas houve entre 6,0 e 7,5. Para outros ainda, o ponto ótimo de crescimento situou-se entre pH 6,75 e 7,5.

O mínimo de a_a que permite o crescimento é 0,97.

Mereceu ainda destaque o trabalho de Serrano (1976) o qual, para obviar as dificuldades deparadas na evidencição da lecitinase, através dos processos até então descritos, modificou o meio de Willis; Hobbs (1958), que já havia sido modificado por Hall *et al* (1969), obtendo de forma clara, em apenas 24 horas, a reação de lecitinase nas culturas.

14.2 Curso de Infecção e Modo de Ação

Segundo Hobbs (1999), o período de incubação da intoxicação causada pelo *Clostridium perfringens* é de 8 a 22 horas, após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas se traduzem por dor abdominal e diarreia, raramente acompanhada de vômitos mas, sim, de náuseas que se prolongam por 12 a 24 horas.

Na pesquisa de Serrano (1976), no Brasil, as freqüências dos sintomas se distribuíram como mostra a Tabela x-x, onde se constata a confirmação do predomínio dos efeitos representados por diarreia e dor abdominal (HOBBS, 1999).

De acordo com relato de Sinell (1981), a condição preliminar para o desencadeamento do surto da enfermidade é a de que os germes se multipliquem no alimento e alcancem índice entre 10^6 e 10^8 /g.

Conforme Genigeorgis (1981) e Craven (1980), as células ingeridas (de 10^6 /g) esporulam prontamente nos intestinos e produzem uma enterotoxina resistente à tripsina responsável pela doença. Uma relação direta entre o grau de esporulação e o rendimento de toxina tem sido demonstrada por Duncam *et al* (1972), com muitas cepas tipo A. Choques de calor repetidos sobre esporos podem conduzir a culturas com habilidade maior para esporular e a maior rendimento de toxina.

Segundo McDonel (1980), a enterotoxina produzida pelo *Clostridium perfringens* é responsável por um dos tipos mais comuns de envenenamento alimentar nos EUA. No entanto, pouco se conhece a respeito do mecanismo pelo qual a enterotoxina causa os sintomas característicos da doença (diarreia, cólicas abdominais). Progresso significativo na compreensão do envenenamento alimentar por *Clostridium perfringens* vem sendo conseguido. Espera-se que pesquisa intensiva resulte numa precisa descrição molecular do mecanismo de ação desta enterotoxina. A descoberta de que um fator enteropatogenico,

produzido durante a esporulação é o responsável pelos sintomas diarréicos na doença, e levou ao isolamento e purificação de uma toxina (McDONEL, 1980). Esta toxina revela-se como o fator primário, responsável pela doença induzida experimentalmente em carneiros, bezerros, galinhas, ratos, coelhos, macacos e homem, de acordo com diversos autores.

Muitos estudos foram realizados recentemente por diversos pesquisadores sobre a atividade biológica, a inibição do metabolismo oxidativo e os danos diretos causados à célula pela enterotoxina. Para McDonel (1980), a direção de pesquisas futuras sobre o mecanismo de ação da enterotoxina do *Clostridium perfringens* se dará indubitavelmente no sentido da realização de estudos bioquímicos e fisiológicos da estrutura e da função de membranas alteradas por esta ação. A enterotoxina do *Clostridium perfringens* causa, como as enterotoxina da cólera, da *E. coli*, do estafilococo e da *Shigella*, acúmulo de fluidos e eletrólitos nas alças ileais tratadas. Entretanto, em contraste com outras enterotoxinas, a do *Clostridium perfringens* inibe o metabolismo energético e a síntese macromolecular. Também causa avaria de estrutura e função de membrana, pela interação aparentemente direta com a célula mais extensa dela. Provavelmente por isso, a enterotoxina perfríngica se inclua numa categoria separada das outras, no que tange ao mecanismo de ação.

A toxina é uma proteína termolábil (60°C/10 minutos), de ação claramente antigênica e com peso molecular de 36.000, com ponto isoelétrico de 4,3.

No intestino delgado, o peristaltismo acentua-se pela secreção de grande quantidade de líquido. Não sendo a toxina pré-formada no alimento, ela não será identificada de maneira específica, devendo-se recorrer ao cultivo do germe para se esclarecer a etiologia. O aquecimento a 80°C, por dez minutos, ativa os esporos que encontram condições para germinar, enquanto morre a flora acompanhante.

14.3 Difusão

É extrema a ubiquidade do *Clostridium perfringens*. As intoxicações por estes microrganismos são frequentes. A gastroenterite provocada pelo *Clostridium perfringens* permanece como uma das doenças de origem alimentar mais comum, associada ao consumo de carnes (GENIGEORGIS, 1986). A doença deve-se, principalmente, ao consumo de *roast beef* e carne de ave aquecida, acompanhada de molhos, sucos e decorações cozidos no dia anterior ou mesmo horas antes da ingestão e que acabaram sofrendo um resfriamento lento. Um cozimento moderado mata as células vegetativas e a flora microbiana competidora da

carne, mas ativa os esporos sobreviventes, que podem, eventualmente, germinar e crescer no baixo meio redox de grande peça de carne cozida, resfriada lentamente.

Em estatística de Hobbs (1999), nos anos de 1965 e 1966, na Inglaterra e no País de Gales, as intoxicações pelo *Clostridium perfringens* corresponderam, respectivamente, a 30 e 35% dos indivíduos afetados, seguindo-se às intoxicações por salmonelas. Nos Estados Unidos Sinell (1981), em 1976, ocupou o terceiro lugar em termos do número de pessoas intoxicadas, atingindo um percentual de 14,2% cedendo lugar apenas aos transtornos alimentares provocados pelas salmonelas (32,7%) e estafilococos (26%).

14.4 Fontes de Infecção

Largamente distribuídos pela natureza, o *Clostridium perfringens* encontra-se no solo e na poeira, na água, nas fezes do homem e dos animais, nas moscas e nos alimentos.

Nas fezes humanas, em quadro estatístico composto por Serrano (1976), o microrganismo compareceu em contagens médias, por grama de fezes, com $8,5 \times 10^6$ em relação às pessoas com intoxicação, $7,5 \times 10^3$ nas pessoas sãs e $1,5 \times 10^4$ nas que apresentam diarreia. Ocorre também, no trato digestivo de bovinos, suínos, aves, cães, gatos e outros animais domésticos.

É também encontrado na água limpa, na residual e na de esgoto. No solo e na poeira, o número de germes é muito grande, chegando a somar-se, em alguns solos, de 110 a 56.700 por grama, com predomínio do tipo A. Abrigando com frequência o microrganismo, as moscas também têm participação importante, como veículo, em sua disseminação. Os alimentos são contaminados a partir dessas fontes.

Em virtude da alta prevalência de *Clostridium perfringens* no trato gastrointestinal dos animais dificilmente se consegue evitar a contaminação da carne fresca por este microrganismo, devendo então ser sempre considerada a possibilidade de sua ocorrência (GENIGEORGIS, 1975; HOBBS, 1999). A invasão endógena de carcaças, como resultado de manuseio impróprio do animal antes do abate, é revelada por Genigeorgis (1986).

O microrganismo não é perigoso quando ingerido em pequeno número. Embora haja uma alta prevalência de *Clostridium perfringens* enterotoxigênico no trato gastrointestinal do homem, segundo Hobbs (1999), os manipuladores de alimento exercem um papel mínimo, como fonte de *Clostridium perfringens*, na contaminação de carnes. Muitas cepas, humana e

animal, são enterotoxigênicas, sendo a produção de toxinas variável de acordo com a cepa e com a origem desta.

Raramente, carnes processadas são fonte de toxinfecção alimentar por *Clostridium perfringens*. Isso provavelmente se deva a um cozimento mais eficiente, à estocagem contínua sob frio após processamento e à presença de sais de cura, em contraposição às carnes frescas não curadas. O *Clostridium perfringens* sobreviveu e cresceu em meios laboratoriais, com níveis de sais de cura consideravelmente mais altos que aqueles usados nas operações normais de cura. De acordo com Hobbs (1999), o risco de envenenamento alimentar por *Clostridium perfringens* em carnes curadas, cozidas, seria reduzido se os produtos fossem estocados somente à temperatura de 20°C ou abaixo desta, por um período não maior que sete dias (mantidos o número de esporos menor que 1/g, o pH de 6,1 ou abaixo e o nível, na carne, de 25 ppm de nitrito com 5,3% de salmoura).

14.5 Alimentos Implicados

O *Clostridium perfringens* e seus esporos são encontrados em muitos alimentos, como carnes de bovinos, vitelos, suínos, aves, ovinos e pescados, tanto crus como processados. Em cuidadosa busca de alimentos suspeitos, Serrano (1976) relacionou os alimentos responsáveis por surtos como as carnes. Relatou ainda outras ocorrências em embutidos, massas, molhos e condimentos.

Segundo Lawrie (1985), referindo-se às modificações experimentadas pela carne em consequência das atividades bioquímicas, independente das toxinas elaboradas, a carne se liquefaz em virtude da ação de uma colagenase (excretada pelo germe), que primeiro hidrolisa o tecido conjuntivo existente entre os feixes musculares; em seguida, observa-se a produção de gás e, depois, os aminoácidos livres da carne são atacados por um desaminase com produção de hidrogênio, dióxido de carbono e aminoácido. O glicogênio presente é transformado, por fermentação, em ácido acético e butírico. Observam-se ainda outras ações como o ataque aos mucopolissacarídeos.

14.6 Ocorrência no Brasil

Pesquisando a ocorrência de *Clostridium perfringens* em produtos alimentares, Serrano (1976) examinou 50 amostras de carne de bovino, moídas em máquinas de açougue;

50 amostras de carne de suíno, em pedaços; 50 de corvina; 50 de frango cortado em pedaços; 35 de lingüiça fresca; 31 de salsicha e 31 de coxinha de galinha, todas colhidas em diferentes retalhistas, com exceção da corvina, que foi obtida em atacadista.

Após homogeneização, as amostras foram inoculadas em placas de ágar-sangue e a confirmação foi feita no meio de Willis e Hobbs.

Para a pesquisa de *Clostridium perfringens* em carne bovina, suína, frango e corvina, foram usados três procedimentos: num, o homogeneizador foi semeado diretamente em ágar-sangue; noutro, a mesma semeadura deu-se depois de um aquecimento de a 80°C, por dez minutos; num terceiro, inoculou-se o homogeneizado em caldo de carne cozida, aquecido em banho-maria fervente, por 60 minutos, sendo a seguir incubado e depois inoculado em ágar-sangue. A frequência média de amostras positivas de carne bovina, nesses meios, foi de 10%, 2% e 4%, respectivamente; de carne suína, foi de 20%, 0% e 6%; de 15%, 0% e 2% para frango; e de 4%, 0% e 0% para corvina. Para a mesma pesquisa, com salsicha, lingüiça e coxinha, foram usados dois procedimentos; num, homogeneizados idênticos de salsicha foram inoculados diretamente em placas; noutro, enriqueciam-se primeiro os homogeneizados em caldo de carne cozida e, depois, inoculava-se esta em ágar-sangue. A frequência de amostras positivas foi de 3% a 6%, respectivamente. Idênticos procedimentos em lingüiça evidenciaram 6% e 6% e 3% e 6%, em coxinhas.

No exame de 120 estufas e, posteriormente, de outras 118 que mantinham produtos para pronto consumo, registram-se, respectivamente, 38,66% e 49,5%, com temperaturas entre 30% e 40°C, condição esta favorável ao desenvolvimento de *Clostridium perfringens*.

Em surto de intoxicação alimentar ocorrido num refeitório, Serrano (1976) realizou um inquérito com 2.015 das pessoas que tomaram a refeição, revelando que 88,2% delas tiveram diarreia; 74,2% dores abdominais; 16,1% tonturas; 14% prostração; 9,7% náuseas; 8,6% vômitos; e 6,5% febre. A média do tempo de incubação foi de 13 horas e a duração dos sintomas, de menos de 24 horas em quase todos os doentes. A contagem de *Clostridium perfringens* nas fezes dos doentes foi maior do que nas das pessoas normais. O alimento mais suspeito de ter causado a intoxicação foi uma maionese, cujos principais componentes eram corvina e batata.

Rudge (1982), no estado de São Paulo, analisou 56 amostras de produtos de origem animal prontas para serem consumidas, sendo oito de lingüiça frescal, envoltas em tripa natural; dez de lingüiça frescal, embaladas em *cry-o-vac*; oito de lingüiça tipo calabresa; dez de paio; dez de hambúrgueres e dez de salame.

O método de isolamento empregado foi o de anaerobiose em jarra de Gás-Pak e, como meio de cultura, o da SPS (sulfito de polimixina-sulfadiazina) e o de TSN (ágar neomicina sulfotriptona). Para a determinação das toxinas A e C do *Clostridium perfringens*, utilizou-se a reação de Nagler, empregando-se o “Sera for the identification os Clostridia”, da Welcome Reagents Limited. Das 56 amostras analisadas, foram detectadas 21 estirpes de *Clostridium*. As espécies encontradas foram: *Clostridium ténue*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium parapfringens*, *Clostridium sporophaerodis* e *Clostridium perfringens*.

Em duas amostras de *Clostridium perfringens*, detectou-se a toxina A.

Dellalibera *et al* (1987) relatam um surto de toxinfecção alimentar, ocorrido em restaurante em Londrina-PR, tendo como provável agente etiológico o *Clostridium perfringens*, que atingiu 113 (60,42%) das 187 pessoas que ali fizeram suas refeições. Os sintomas observados foram cólica abdominal e diarreia.

14.7 Prevenção

Referindo-se Hobbs (1999) ao fato de que, 89% dos surtos deveram-se a produtos cárneos, há que se precaver de modo especial com estes produtos. A proteção da carne contra o crescimento do *Clostridium perfringens* é semelhante à utilizada contra a maioria dos microrganismos patógenos. Ela se baseia no seu reduzido crescimento a temperatura abaixo de 15°C, ressaltando-se que a temperatura crítica de conservação dos produtos cárneos está abaixo de 5°C na alimentação comunitária ou no âmbito doméstico e, sob certos aspectos, também na indústria, os alimentos, cozidos sempre acima de 65,5°C, desde que não venham a ser consumidos ou processados imediatamente, terão sua temperatura rebaixada a pelo menos 4,4°C. No comércio, prescrevem-se cuidados especiais para produtos prontos, mantidos em mostruários tipo estufa, sugerindo Nickerson; Sinskey (1985) que a temperatura deva estar no mínimo a 65,5°C.

Os fatores que mais contribuem para a ocorrência de surtos provocados pelo *Clostridium perfringens* são: resfriamento inadequado da carne, manutenção a quente imprópria, preparação do alimento um dia ou mais antes de servi-lo e reaquecimento inadequado. Considerando-se o curto tempo em geração de sete a oito minutos, em temperatura ótima de crescimento, a significância desses fatores, especialmente em estabelecimentos preparadores de alimentos, é compreensível.

Genigeorgis (1986) avaliou os pontos críticos de controle na preparação do *roast beef* em um determinado estabelecimento produtor. Verificou que o uso de temperaturas quentes na manutenção permitiu uma sobrevivência de 26% de células vegetativas patogênicas no centro geométrico e 43% delas nas superfícies dos *roast* examinados. Durante o resfriamento, o crescimento de 83% desses microrganismos seria possível no centro geométrico e 79% sobre a superfície e o reaquecimento possibilitaria a sobrevivência de 90% no centro geométrico e 10% sobre a superfície. Nessas condições, se esporos de *Clostridium perfringens* sobrevivessem ao cozimento e se ele ou outros patógenos, tais como estafilococos e salmonelas, fossem introduzidos após o cozimento, segundo Bryan (1978) ocorreriam surtos de doenças de origem alimentar.

15 BACILLUS CEREUS

O *Bacillus cereus* assumiu maior importância em virtude dos surtos de intoxicação a ele atribuídos, sobretudo nos países escandinavos. É um microrganismo aeróbio, formador de esporos, tendo como temperatura ótima de crescimento 30°C, desenvolvendo-se melhor na faixa de pH situada entre 4,9 e 9,3. Price; Schweigert (1976) referem-se ao *Bacillus cereus* como facultativo em relação ao oxigênio.

O primeiro surto de contaminação pelo *Bacillus cereus* foi relatado em 1947 por Plasikowski. Segundo Genigeorgis (1986), entre 1978 e 1981, dois dos 12 surtos de intoxicação por *Bacillus cereus*, registrados nos EUA, deveram-se a carne e cinco a alimentos desconhecidos. Ao contrário disto, Gilbert (1979) mostra que, dos 110 surtos registrados no Reino Unido entre 1971 e 1979, 108 deviam-se a arroz cozido e dois a creme pasteurizado. Na Hungria, de 1960 a 1968, o *Bacillus cereus* foi a terceira causa mais comum de envenenamento alimentar, sendo produtos cárneos as causas mais evidentes. Esses surtos se devem ao fato de que os pratos cárneos húngaros são comumente bem condimentados com especiarias que, frequentemente, contém grande número de *Bacillus spp*, incluindo o *Bacillus cereus*. Assim, esporos sobreviventes ao cozimento germinam e crescem em alimentos não refrigerados ou refrigerados lentamente.

15.1 Modo de Ação e Sintomas

Comprovou-se que o *Bacillus cereus* produz, durante a fase logarítmica de crescimento, uma enterotoxina protéica que se difunde pelo alimento provocando depois as manifestações tóxicas. Coincide este fato com a observação de que é necessária a ingestão de grande número de microrganismos para o desencadeamento dos fenômenos tóxicos. Considerou-se um mínimo de $10^7/g$ de microrganismos para que se produza a intoxicação. Segundo Genigeorgis (1986), é necessária uma população de mais de $10^5/g$ para a ocorrência de um surto.

O *Bacillus cereus* forma uma fosfolipase C, uma hemolisina e uma toxina letal. Nenhuma delas, porém, é análoga à enterotoxina que provoca a intoxicação alimentar. Os sintomas aparecem entre oito e 16 horas ou, às vezes, entre duas e quatro horas após a ingestão do alimento contaminado, caracterizando-se por náuseas, dores abdominais, diarreia

aquosa e, raramente, vômitos. A febre comumente não se apresenta. Os sintomas descritos duram em regra mais de 12 horas.

Em surtos descritos por Sinell (1981), em que adoeceram 600 noruegueses, o diagnóstico deveu-se às estirpes isoladas do alimento incriminado (molho de baunilha guardado à temperatura ambiente), mediante cultura.

Observou-se recentemente uma segunda forma de intoxicação por *Bacillus cereus* na qual, após um período de incubação de uma a cinco horas, apresentavam-se sintomas parecidos com os manifestados na enfermidade provocada pelo *Staphylococcus aureus*, isto é, náuseas, vômitos e gastroenterite aguda.

Segundo Gilberth (1979), o *Bacillus cereus* é responsável por duas síndromes de origem alimentar: uma se assemelha à intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens* e se caracteriza por diarreia e longo tempo de incubação (oito a 16 horas). Todos os surtos relatados, devidos a produtos cárneos, foram causados por duas proteínas essenciais ao desenvolvimento da diarreia. A segunda síndrome é semelhante à intoxicação estafilocócica e é devida a uma exotoxina emética, de natureza desconhecida. Os surtos advindos de arroz e de outros alimentos amiláceos são quase que exclusivamente de síndrome tipo emética.

Santiago (1972) refere-se a observações segundo as quais a ação do *Bacillus cereus* se exerce mediante uma enterotoxina associada à célula e liberada por lise, o que se justifica pela necessidade do grande número de células para o desencadeamento da resposta, pelo rápido aparecimento e curta duração da resposta e, ainda, pela ausência de febre.

Em face da ubiquidade do *Bacillus cereus*, bem como de outros esporógenos, sua simples presença no alimento não autoriza a colocá-lo como causa de intoxicação alimentar.

15.2 Fontes de Infecção

Semelhantemente aos microrganismos aeróbios esporógenos, o *Bacillus cereus* é sobretudo um microrganismo dos solos. As poeiras e outras transgressões higiênicas são responsáveis pela contaminação do ambiente e dos alimentos. O *Bacillus cereus* é prevalente no solo, numa grande variedade de cereais, nos produtos lácteos, nos condimentos e nos produtos cárneos (JOHNSON, 1984).

15.3 Alimentos Implicados

A despeito de Frazier (1993) ter se referido apenas aos amiláceos, além do arroz e de outros cereais são também fontes de infecção o creme, determinados molhos, pudins, sopas, purês de bata, verduras, embutidos cozidos, almôndegas, carnes moídas, condimentos e, ocasionalmente, pescado. Num foco húngaro, relatado por Sinell (1981), em que houve 88 surtos, com 8.560 enfermos de 1960 e 1966, houve pronunciada participação de preparados de carne, principalmente pratos para consumo imediato.

15.4 Prevenção

Deve-se evitar a todo custo a contaminação por terra ou poeiras. Após a cocção, deve-se consumir ou processar os alimentos. Em caso contrário, mantê-los a 4,4°C, assumindo-se os mesmos cuidados preconizados para o *Clostridium perfringens*.

16 LISTERIA MONOCYTOGENES

A listeriose é uma infecção de origem alimentar causada pela *Listeria monocytogenes*, bacilo Gram positivo, amplamente disseminado no solo, vegetação, água, esgoto, além de inúmeras espécies animais. Embora seja uma doença com baixa prevalência, sua importância na saúde pública se justifica pela severidade das sequelas e pelos altos índices de mortalidade, que giram em torno de 20 a 40% em populações imunocomprometidas. O agente resiste em altas concentrações de cloreto de sódio e nitratos multiplica-se em ampla faixa de temperatura, especialmente as de refrigeração. Sua capacidade de formar biofilmes e sua ação de parasitismo intracelular são fatores que tornam o agente ainda mais relevante no cenário epidemiológico (FAO/WHO, 2001; GERMANO; GERMANO, 2003).

Caracteriza-se como uma infecção severa, ocasionando um conjunto de alterações patológicas, dentre elas: septicemia, meningoencefalite, encefalite, infecção cervical ou intra-uterina, capazes de resultar em aborto ou prematuridade. Securitariamente podem ocorrer endocardites, lesões granulomatosas viscerais, abscessos e lesões cutâneas. Seu diagnóstico é realizado isolando-se a *Listeria monocytogenes* no líquido, sangue, líquido amniótico, placenta, mecônio, lavado gástrico ou fezes, sendo este último de pouco valor.

Nas últimas duas décadas, a presença de *Listeria monocytogenes* em vários alimentos tem despertado o interesse na área de microbiologia, em razão da sua alta patogenicidade ao homem, assim como pela ocorrência de vários surtos em todo o mundo.

16.1 Transmissão

Segundo Mena *et al.* (2004), a listeriose pode acometer qualquer pessoa, estando mais suscetíveis os indivíduos mais jovens, os idosos e, particularmente, aqueles com imunodeficiência.

Embora não apresente alta incidência na maioria dos países, a listeriose humana mantém alertas as autoridades de saúde, a indústria alimentícia e a população (BARBALHO *et al.*, 2005) que, em recém-nascidos é de 30% e em adultos 35%, sendo que aproximadamente 11% das mortes são observadas em indivíduos com idade inferior a 40 anos e a maioria dos óbitos ocorre acima dos 60 anos de idade (63%).

O aumento da frequência de alimentos contaminados pela *Listeria monocytogenes* foi atribuído por Romanova *et al.* em 2002, a fatores como uma vigilância sanitária mais efetiva,

uma possível adaptação da bactéria durante a produção e processamento de alimentos e a uma aquisição de resistência da bactéria aos sanitizantes utilizados na indústria alimentícia. A *Listeria monocytogenes* pode revelar resistência à pasteurização, mediante determinadas condições, podendo ser considerado um germe “termodúrico” (ICMSF, 1996). Essa bactéria revela uma acentuada psicofilia, ou seja, capacidade para se multiplicar a baixas temperaturas, coloca vários problemas à aquisição, transformação e comercialização de diversas matérias primas, multiplicando os pontos críticos relevantes na cadeia alimentar.

Por outro lado, embora as populações de *Listeria* cresçam melhor a valores de pH próximos da neutralidade ou ligeiramente alcalinos, este é um microrganismo bastante tolerante a acidez e, inclusivamente a “ choques ácidos”, o que pode ter como consequência uma redução na dose infectante. De fato essa bactéria pode desenvolver resistência a condições de acidez posteriores, como aquelas que se verificam no estômago. Adicionalmente, sabe-se que *Listeria monocytogenes* é um microrganismo halotolerante, que sobrevive em concentrações elevadas de sal (RYSER; MARTH, 1987)

O desenvolvimento da patologia está diretamente relacionado à ingestão de alimentos como carne, queijo, vegetais e peixe contaminados pelos agentes causais de doença (ILDA *et al.*, 1998; NORWOOD; GILMOUR, 1999; MENA *et al.*, 2004)

A disseminação da *Listeria monocytogenes* é determinada principalmente pela contaminação cruzada das instalações, equipamentos, utensílios e alimentos, decorrentes de falhas no processo higiênico durante a produção, conservação, preparo e consumo de alimentos. Leite não pasteurizado, carnes cruas e vegetais mal desinfetados; alimentos prontos para consumo, como pratos de “roisserie”; salsichas; queijos e frios em geral, podem veicular a infecção (FAO/WHO, 2001; GERMANO; GERMANO, 2003).

16.2 Curso da Infecção

No início da infecção, assemelha-se a um resfriado comum, com febre, dores musculares e distúrbios gastrointestinais. Nas pessoas saudáveis a recuperação é rápida, sem evolução do quadro clínico. Contudo, em idosos, crianças e pessoas com o sistema imunológico comprometido, ocasionado por AIDS, câncer e outras doenças, a listeriose pode resultar em: septicemia, meningite, meningoencefalite, endocardite, levando a óbito de 20 a 40% dos casos (GERMANO; GERMANO, 2003).

Gestantes possuem doze vezes mais chance de serem acometidas pela listeriose em relação à população em geral. Embora a gestante não manifeste sintomas preocupantes, as probabilidades de aborto e parto prematuro são grandes, em função da invasão da placenta pela bactéria, atingindo o feto, que ainda não dispõe de sistema imunológico capaz de se defender do agente. A *Listeria monocytogenes* é considerada a terceira causa de meningite em recém nascidos e é responsável por índices entre 30 a 50% de partos prematuros, abortamentos e morte neonatal (SCHWAB, 2003).

16.3 Microorganismo

No início da década de 1980 o aumento de ocorrência de surtos de listeriose nos EUA e Europa demonstraram que a listeriose tratava-se de uma doença de grande importância em saúde pública. Ao longo das últimas décadas a sorotipagem vem sendo largamente utilizada para identificação da *Listeria monocytogenes*, porém a técnica apresenta limitações em relação ao tempo exigido para obtenção de resultados e principalmente em relação à sua eficiência na detecção de todos os sorotipos presentes nas amostras analisadas.

No Brasil, Schwab; Edelweiss (2003) confirmaram a presença do agente em 33% das placentas que apresentavam alterações anátomo-patológicas, índices também encontrados por outros autores no Brasil e no mundo. A literatura também refere a melhora clínica e laboratorial, em casos de diagnóstico precoce e emprego de antibióticoterapia (SCHWAB, 2003). Uma das características da *Listeria monocytogenese* que desperta interesse e preocupação nos pesquisadores, é sua habilidade de se desenvolver em ambientes com baixas temperaturas e com atividade de água reduzida, já que essas são medidas geralmente adotadas pela indústria para controlar o crescimento de patógenos nos alimentos (MENA *et al.*, 2004). Outros estudos reforçam a resistência da bactéria, que pode sobreviver e se desenvolver perante condições como: baixa temperatura, baixa concentração de oxigênio, baixo pH e alta concentração de NaCl (BONILAURI *et al.*, 2004).

16.4 Isolamento do Agente

Algumas dificuldades no controle da doença como a recuperação de organismos envolvidos nos surtos; a subnotificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos importantes fatores que retardam ou impedem interações em situações de

emergência. Essas características, associados ao fato de que a bactéria apresenta alta virulência, a partir de baixa dose infectante, dificultam o controle e prevenção da listeriose e colocam a doença na condição de relevância para a saúde pública, nas esferas das vigilâncias sanitárias e epidemiológica, envolvendo a investigação de surtos, o desenvolvimento de novas técnicas de garantia da qualidade e inocuidade de alimentos, consolidação do comércio exterior de alimentos, entre outros (DESTRO, 1996, FAO/WHO, 2001; HOFER, 2000).

Nos últimos anos, as técnicas moleculares de sequenciamento genético, e principalmente as análises genéticas comparativas, vem promovendo um grande avanço na precisão e rapidez, para a obtenção de dados relativos ao patógeno, no que se refere ao entendimento de sua biologia, fatores de virulência, evolução, diferenças fenotípicas e, conseqüentemente, nas ações de diagnóstico e prevenção (DESTRO, 1996).

16.5 Contaminação cruzada e análise de risco

A capacidade da bactéria de formar biofilmes vem sendo um dos maiores desafios no controle sanitário e garantia de inocuidade dos alimentos. A resistência das cepas submetidas à ação dos agentes sanitizantes demonstra a importância para a vigilância sanitária e indústrias sobre novos processos e produtos saneantes que sejam mais eficientes no controle do patógeno (DESTRO, 1996, FAO/WHO, 2001; GERMANO; GERMANO, 2003).

A contagem de bactérias de um produto pode aumentar durante sua armazenagem em ambientes refrigerados de menos de 100 células por grama, relação considerada inócua, para mais de 100.000 células por grama, por períodos superiores a três ou quatro semanas, tempo médio de armazenamento de muitos produtos (GUDBJÖRNSDÓTTIR *et al.*, 2004).

Em plantas de processamento de alimentos, a instituição do sistema de APPCC, auxiliado pelo emprego das técnicas moleculares, contribuem para um controle mais acurado dos perigos de natureza microbiológica (FAO/WHO, 2001).

A análise de risco para *L. monocytogenes* em alimentos pronto para o consumo proposto pela FAO/OMS teve inicialmente o papel de orientar sobre como os padrões nacionais poderiam se igualar aos internacionais. Ao mesmo tempo, propõe-se a determinar três principais aspectos relacionados ao consumo de alimentos prontos para o consumo, a saber:

a) a análise de risco para populações suscetíveis (recém nascidos, gestantes, imunocomprometidos e idosos);

b) Análise de risco para diferentes alimentos, quanto à capacidade de multiplicação da bactéria;

c) Determinar limites de contagem microbiana, quando da não presença em até 25 gramas ou mililitros de alimento. Como resultado dessas ações, espera-se determinar novas doses infectantes da bactéria em alimentos pronto para o consumo.

16.6 Ocorrência no Brasil

No Brasil, casos de listeriose transmitidos através dos alimentos ainda é assunto recente, sem dados registrados, embora *Listeria monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos tipos de alimentos. *Listeria monocytogenes* é um patógeno emergente e sua habilidade de sobreviver por longos períodos em condições adversas o tornam signeficante na cadeia de produtos de alimentos (GERMANO; GERMANO, 2003).

16.7 Prevenção

A prevenção da listeriose (FAO/WHO, 2001; GERMANO; GERMANO, 2003) requer que os grupos de risco eliminem o consumo de alimentos como o leite não pasteurizado e carnes cruas; evitar consumir (ou reaquecer) alimentos prontos para consumo. Os cuidados higiênicos no preparo de vegetais consumidos crus, bem como equipamentos e utensílios e a adoção do sistema APPCC previnem a formação de biofilmes e consequentemente contaminação persistente da *L. monocytogenes* nos maquinários. Gestantes devem incluir a pesquisa de *L. monocytogenes* no pré-natal, especialmente na ocorrência de sintomas de resfriado. A carne é um alimento perecível, e a menos que seja conservada de forma bastante adequada, torna-se inapropriada para consumo em curto período de tempo (SHIMONI; LABUZZA, 2000)

Fatores como embalagem adequada, higienização e utilização de sanitizantes nas indústrias, parecem diminuir a frequência de contaminação nas carnes, melhorando sua sanidade e qualidade para o consumo.

Zhang *et al.* (2005), destacam a importância de uma vigilância efetiva, em relação a armazenagem da carne e derivados, já que a demanda por produtos manufaturados apresenta-se em ascensão, principalmente devido a sua praticidade, pois os produtos chegam ao consumidor já cortados ou moídos e limpos. A ausência de higiene e condições adequadas

durante os processos de corte e armazenagem em lojas de conveniência, supermercados e açougues, podem desencadear a proliferação de microrganismos, bem como a deterioração do produto, acarretando sérios prejuízos para a saúde pública. Um dos fatores fortemente relacionados à contaminação da carne pela *Listeria monocytogenes*, é a higiene, tanto ambiental como individual (YUCEL *et al.*, 2005). Segundo Nel *et al.* (2004), um dos maiores fatores de risco para a contaminação de alimentos, é a prática de higiene das pessoas que os manipulam. Os mesmos autores enfatizam que uma maior sanidade da carne pode ser alcançada com o conhecimento de medidas de higiene pessoal, condições de saúde individual, limpeza dos locais e superfícies onde a carne é manipulada e de disponibilidade de recursos como: vestuário, toaletes, sanitizantes, entre outros. Norwood; Gilmour (1999), descrevem que em praticamente todos os casos de contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos, a bactéria pode ser isolada em todo o ambiente da indústria, como esgoto, ralos, locais com estagnação de água, nos resíduos, superfícies onde o produto foi manipulado e no chão. Frente à alta resistência da *Listeria* e sua capacidade de aderir aos mais diversos tipos de superfícies, as indústrias adotam medidas para a eliminação da bactéria como o uso de sanitizantes (NORWOOD; GILMOUR, 1999); estes produtos são amplamente utilizados em áreas onde ocorre a manipulação dos alimentos e, conseqüentemente, maior risco de contaminação dos mesmos.

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico com bastante impacto na saúde pública, que requer uma especial preocupação por parte dos produtores de alimentos pela capacidade que apresenta em sobreviver, e frequentemente multiplicar-se, numa gama bastante alargada de condições adversas, como é o caso das temperaturas, altas e de refrigeração, valores baixos de pH e elevada osmolaridade (GUERRA, 2006).

Embora seja uma doença de baixa prevalência, a listeriose tem relevância na saúde pública pelo alto grau de severidade das seqüelas e alta taxa de letalidade em populações de risco, como pacientes imunocomprometidos, idosos e gestantes. A doença é veiculada especialmente do consumo de alimentos contaminados, merecendo destaque especial os produtos prontos para consumo, leite e carnes cruas e vegetais mal higienizados. As dificuldades de isolamento do agente, a desinformação dos profissionais da saúde, as dificuldades de diagnóstico de listeriose e a demora na investigação de surtos são alguns dos principais fatores que retardam o controle da doença ou impedem sua prevenção. Considerando o aumento da prevalência de *L. monocytogenes* no mundo todo (FAO/WHO, 2001; HOFER, 2000), faz-se justificada a necessidade de novos estudos, especialmente

utilizando as técnicas moleculares, a fim de elucidar aspectos relacionados ao comportamento da bactéria, sua prevalência, mecanismos de virulência e outros fatores de relevância para a saúde .

17 CONCLUSÃO

A atenção na área de segurança alimentar sempre se faz necessária devido ao perigo causado pelas doenças transmitidas por alimentos em frente à saúde pública. Melhorias nos métodos de processamento de alimento e a conscientização a respeito da saúde alimentar de todos os envolvidos na cadeia de produção de alimentos certamente reduziriam a incidência das doenças de origem alimentar.

Práticas inadequadas que ocorrem durante o processamento permitem as contaminações pela sobrevivência e multiplicação de microrganismos nos alimentos, em destaque as bactérias.

A implantação de Boas Práticas de Fabricação se faz obrigatória para promover a segurança alimentar aos consumidores, de modo eficaz e eficiente no controle das DTAs. Devido à conscientização do público em relação às doenças transmitidas por alimentos, é importante que todas as companhias alimentícias mantenham altos padrões de higiene e garantam a segurança de seus produtos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n. 6, p. 578-580, dez. 2000.
- ALMEIDA FILHO, E. S. et al. *Vibrio vulnificus* em pescado, uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116, p.23-28, jan. 2004.
- ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, p. 285-293, sep. 1997.
- ALVES, L.M.C. et al. Toxinfecção alimentar por *Salmonella Enteritidis*; Relato de um surto ocorrido em São Luís- MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80, p. 57-58, jan. 2001.
- ARNON, S. S. Infant botulism: pathogenesis, clinical aspects and relation to crib death. **Annual Review of Medicine**, California, v. 31, n. 13, p. 541-560, jan. 1981.
- ASSUMPÇÃO, E. G. et al. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 366-370, jun. 2003.
- BARBALHO, T. C. F. et al. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, Great Britain, v. 16, n. 3, p. 211-16, apr. 2005.
- BARROS, G. C. *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em crustáceos e moluscos na Baía de Sepetiba – RJ. 1977. 75 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1977.
- BERGDOLL, M. S., BORJA, C. R., AVENA, R. M. Identification of a new-enterotoxin as enterotoxin C, **Journal of Bacteriology**, Chicago, v. 90, n. 13, p. 1481-1485, nov. 1965.
- BEUCHAT, L. R. *Vibrio parahaemolyticus*: public health significance. **Food Technology**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 80-83, jun. 1982.
- BORLAND, E.D. *Salmonella* infection in poultry. **Veterinary Record**, Great Britain, v. 97, n. 10, p. 406-408, jan. 1975.
- BLASER, M. J. et al. *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiologic features. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 91, n. 20, p. 179-185, aug. 1979.
- BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni* and food. **Food Technology**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 89-92, mar. 1982.
- BONILAURI, P. et al. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged horsemeat for human consumption. **Meat Science**, Parma, v. 68, n. 4, p. 671-4, dec. 2004.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: A panoramic view of a charismatic microorganism. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 5, p. 211, oct. 1977.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 mar. 1977.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 001, de 28 jan. 1987. Aprova os Padrões Microbiológicos para Produtos (alimentos) expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 fev. 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos**. Brasília, 1997. 77p,

BRAUN, P. et al. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. **Food Microbiology**, Leipzig, v. 16, n. 5, p. 531-540, oct. 1999.

BRITO, M. A. V. P. et al. Caracterização de biótipos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 425-429, out. 2000.

BROWN, L. W. Current controversies in the Management and Treatment of infant botulism. 4. ed. New York, Academic Press, 1981. v. 2, cap. 7, p. 347-358.

BRUCE, D.; ZOCHOWSKI, W.; FERGUSON, I. R. *Campylobacter enteritis*. **British Medical Journal**, London, v. 12, n. 2, p. 1219-1233, aug. 1977.

BRYAN, F. L. *Staphylococcus aureus*. In: **Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects**. 2.ed. Westport: AVI Publishing CO, 1976. v. 3, cap. 1, p.12-47.

BRYAN, F. L. Factors that contribute to outbreaks of foodborn disease. **Journal of Food Protection**, Tennessee, v. 41, n. 10, p.816-827, 1978.

CÁCERES, P.; CASTILLO, D.; PIZARRO, M. Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: Characterization of *Micococcaceae*. **International Dairy Journal**, Great Britain, v.7, n. 70, p.531-536, jul. 1997.

CARVALHO, A. C. F. B., et al. *Campylobacter* em granja avícola. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v.96, n. 540, p. 191-195, out. 2001.

CASMAN, E. P. Staphylococcal food poisoning. **Health Laboratory Science**, Michigan, v.4, n. 9, p.199-206, jan. 1967.

CORRÊA, W.W., CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**, 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI-RJ, 1992. 175 p.

CRAVEN, S. E. Growth and sporulation of *Clostridium perfringes* in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 34, n. 4, p. 80, apr. 1980.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G.M.; SATMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, dez. 2002.

DACK, G. M. **Food poisoning**. 3a ed. Chicago: Chicago Press, 1956. 137 p.

DADISMAN, Jr., T. A. et al. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritirm in Maryland I, clinical and epidemiologic aspects. **American Journal of Epidemiology**, Maryland, v. 96, n. 32, p. 414- 416, nov. 1973.

DELORME, L et al. Enteritis due to *Campylobacter jejuni* in the Paris area. **Medicine Malpractice Infeccion**, Paris, v. 9, n. 20, p. 675-677, dec. 1979.

DELAZARI, I. et al. *Clostridium botulinum* em pescado no litoral do Estado de São Paulo. II. Ocorrência em ostras (*Crassostrea brasiliiana*) e camarão sete barbas (*Xiphopennaeus kroyeri*) e influência da metodologia de exame da bactéria. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 1, n. 7, p. 96-99, 1982.

DELAZARI, I., ÁVILLA, Z. S. Botulismo: ocorrência, diagnóstico e medidas terapêuticas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 132-148. Set. 1983.

DELLALIBERA, S. F. B.; TEODORO, A. M. C.; PIAN CASTELLI Fº, B. Investigação epidemiológica em torno de um surto de toxinfecção alimentar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOONOSE, 1., 1987, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1987. P. 98.

DESTRO MT, LEITÃO MFF. FABER JM. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 705-711, fev. 1996.

DOYLE, M. P.; SCHUENI, J. L. Survival of and characteristics of *E. coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Maryland, v. 48, n. 1, p. 855-862, may 1984.

ELEK, S. D. **Staphylococcus pyogenes and its relation to disease**. 2. ed. London: E and S Livingstone, 1959. 657 p.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, jul. 2004.

- FAO/WHO 2001 Joint FAO/WHO Expert consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Risk Characterization of *Salmonella* in Egg and Broilers and *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. **FAO and Food Nutrition Paper**, Rome, v.6, n. 72, p 176-200, may 2001.
- FENIMAN, C. M.; MUCELIN, C. A. Avaliação Microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira –PR. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104, p. 77-78, jan/. 2003.
- FONTES, C. F. et al. Isolamento de uma amostra de *Yersinia enterocolitica* das fezes de uma criança na cidade de São Paulo. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 167-168, jun. 1978.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. 988 p,
- FRANCIS, D. W., SPAULDING, P. L., LOVETT, J. Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Cincinnati, v. 40, n. 1, p. 174-176, July 1980.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 552 p.
- FRANCO, R.M. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana**. 2002. 253 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.
- FRANCO, R. M. Isolamento e identificação de *Campylobacter jejuni* em fígados de aves comercializadas em São Gonçalo –RJ, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 45, 1987, Viçosa. **Resumos**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1987. p. 99.
- FRAZIER, W. C., WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**.6. ed. Zaragoza: Ed. Acribia., 1993. 531 p.
- FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vaca com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-319, jul. 1990.
- GENIGEORGIS, C., SADLER, W. W. Immunofluorescent detection of staphylococcal enterotoxin B. I. Detection in culture media. **Journal of Food Science**, Washington, v. 31, n. 3, p. 441-449, may 1966.
- GENIGEORGIS, C. Public health importance of *Clostridium perfringens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, California, v. 167, n. 9, p. 821-827, sep. 1975.
- GENIGEORGIS, C. Fermented sausage recent experience. **Journal of Food Science**, Tennessee, v. 48, n. 9, p. 368-373, dec. 1978.

GENIGEORGIS, C., RIEMANN, H. Food processing and hygiene. In: RIEMANN AND BRYAN, **Foodborne infection and intoxications**. New York: Academic Press, 1979, cap. 11, p. 613-642.

GENIGEORGIS, C. Recent trends in foodborne diseases of bacterial origin. **Food Technology**, Dortmund, v. 19, n. 6, p. 65-70, may 1981.

GENIGEORGIS, C. Problems associated with perishable processed meats. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 4, p. 140-154, jan. 1986.

GERMANO & GERMANO, **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Varela, 2003. 732 p.

GIESSEN A. W. et al. The identification of *Salmonella enteritidis* - infected poultry flocks associated with an outbreak of human salmonellosis. **Epidemiology Infection**. Omaha, v. 109, n. 23, p. 405-411, feb. 1992.

GILBERTH, R. J. *Bacillus cereus gastroenteritis*. In: **Foodborne Infections and intoxications**. 10. ed. New York: Academic Press, 1979, v. 1, cap. 10, p. 495-526.

GIORGI, W. **Animais domésticos como portadores de Salmonella: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública**. 1982. 104 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

GONZALES, A. G. M.; MONTEIRO, M. F. F.; OLIVEIRA, C. A. G. Avaliação higiênico-sanitária do queijo de soja (tofu), **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 51, p. 33-35, ago. 1997.

GUERRA M.M., BERNARDO F. A. Multiplicação e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* sob condições ecológicas desfavoráveis. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 139, p. 65 -73, jan. 2006.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B. et al. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, Helsinki, v. 21, n. 2, p. 217-25. jun. 2004.

HANNA, M. O. et al. Effect of heating, freezing and pH on *Yersinia enterocolitica* like organisms from meat. **Journal of Food Protection**, Chicago, v. 40, n. 16, p. 689-692, oct. 1977.

HANNINEN, M. L. The effect of NaCl on *Campylobacter jejuni/coli*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 22, n. 65, p. 578-583, mar. 1981.

HARRISON, M. A. et al. Risk of *Clostridium botulinum* type E toxin production in blue crab meat package in four commercial type containers. **Journal of Food Protection**, Minnesota, v. 59, n. 3, p. 257-260, mar. 1995.

HARSHMAN, S.; LEFFERTS, P. L.; SNAPPER, J. R. Staphylococcal alpha toxin: a study with chronically instrumental awake sheep. **Infection and Immunity**. Arkansas, v. 60, n. 9, p. 3489-3496, sep. 1992.

HOBBS, B. C. *Clostridium perfringens gastroenteritis*. In: **Foodborne infection and intoxications**. New York: Academic Press, 1979. v. 1, cap. 3, p. 131-147.

HOFER E, RIBEIRO R, FEITOSA DP. Species and Serovars of the Genus *Listeria* Isolated From Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 615-620, set. 2000.

HUHTANEN, C. N., KNOX, D., SHIMANUKI, H. Incidence and origin of *Clostridium botulinum* spores in honey. **Journal of Food Protection**, Longmont, v. 44, n. 11, p. 812-814, aug. 1981.

HURVELL, B. Zoonotic aspects of *Yersinia enterocolitica* infections. **Nord Vet Med**, Uppsala, v. 30, n. 16, p. 305-317, feb. 1978.

ILDA, T. et al. Detection of *Listeria Monocytogenes* in humans, animals and food. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 60, n. 12, p. 1341-1343. apr. 1998.

INOUE, M.; KUROSE, M. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from cow's intestinal contents and beef meat. **Journal of Veterinary Science**, Shimane, v. 37, n. 26, p. 91-93, oct. 1975.

INOUE, M.; NAGAO, H. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from bovine cecal contents, comercial meat and meat shops. **Journal of Clinical Microbiology**, Yokohama, v. 29, n. 30, p. 612-616, jan. 1976.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) *Listeria monocytogenes*. **Microbiological Specifications of Food Pathogens**, London, v. 2, n. 13, p. 41-182, nov. 1996.

ISEPON, J. S.; SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 89-94, março 2003.

ITO, K. A., CHEN, J. K. Effect of pH on growth of *Clostridium botulinum* in foods. **Food Technology**, New York, v. 32, n. 1, p. 71-76, feb. 1978.

JASPER, D. E.; INFANTE, F.; DELLINGER, J. D. Relationships among the results IF coagulase, Staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on Staphylococci from cow milk. **Journal of clinical Microbiology**, Washington, v. 21, n. 4, p. 582-584, aug. 1985.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. 3º ed. Zaragoza: Acribia, 1994, 1219 p.

JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* foodborne illness: an update. **Journal of Food Protection**, Tennessee, v. 47, n. 43, p. 145-150, jan. 1984.

JOHNSON, H. C., LISTON, J. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to cold oysters, fish filets and crabmeat. **Journal of Food Science**, California v. 38, p. 437-444, jan. 1973.

JOHSTON, R. W. *Salmonella* in meat and poultry products. **Dairy and Food Sanitation**, Washington, v. 3, n. 6, p. 415-422, oct. 1983.

JUNEJA, V. K., SNYDER, O. P., MARMER, B. S. Potential for growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* and vegetative cells of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* serotypes in cooked ground beef during cooling. **Journal of Food Protection**. v.60, n.3, p272-275, 1997.

KWANG, J., LITLEDIKE, E.T., KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Lett. Appl. Microbiol**, Georgia, v. 22, n. 42, p. 46-51, mar. 1996.

KORNACKI, J. L.; MARTH, E. H. Foodborne illness caused by *E.coli*; a review. **Journal of Food Protection**, Michigan, v. 45, n. 24, p. 1057-1063, jan. 1982.

LAWRIE, R. E. **Ciencia de la carne** 8. ed. Zaragoza: Acribia, 1985, 735 p.

LEITÃO, M. F. F. Qualidade e Segurança Alimentar em Produtos Avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 3., 2002, Campinas, **Anais**. Fundação APINCO de Ciências e Tecnologias Avícolas, 2002. p. 215.

LIMA, T. C. S.; GRISI, B. M.; BONATO, M. C. M. Bacteria isolated from sugar cane agroecosystem: their potential production of a polyhydroxyalcanoates and resistance to antibiotics. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 214-224, jul. 1999.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, dez. 2001

LUCINESCO, S.; LUCINESCO, A. N.; FILIP, V. et al. Cercatari asupra infectioci umane su *Yersinia enterocolitica*. **Mikrobiol Parasiti Epidemiologi**, Firenze, v. 15, n. 6, p. 537-545, feb. 1970.

LYNT, R. K., KAUTTER, D. A., SOLOMON, H. M. Differences and similarities among proteolytic and non proteolytic strains of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F: a review. **Journal of Food Protection**. Miami, v. 45, n. 5, p. 466-474, may 1982.

MARK, M. I. et al. *Yersinia enterocolitica gastroenteritis*. A prospective study of clinical bacteriologic and epidemiologic features. **Journal of Pediatrics**, New Castle, v. 96, n. 7, p. 26-29, jul. 1980.

MARTH, E. H.; HALPIN-DOHNALEK, M. I. Characterization of strains of *Staphylococcus aureus* by their lipolytic activity on various Agar media. **Journal of Food Science**. Michigan, v. 55, n. 2, p. 591-608, aug.1990.

McDONEL, J. L. Mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Food Technology**, Tennessee, v. 34, n. 4, p. 91-95, feb. 1980.

MENA, C. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, Lisboa, v. 21, n. 7, p. 571-578, jan. 2004.

METAXOPOULOS, J. et al. Production of Italian dry salami: effect of starter culture and chemical acidulation on *staphylococcal* growth in salami under commercial manufacturing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Parma, v. 42, n. 17, p. 863-870, out. 1981.

MILETI, D. I. C. **Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em suínos; teste de viabilidade em produtos de salsicharia frescal**. 1983. 106 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1983.

MOLLARET, H. H.; DESTOMBES, P. Les germes "x" en pathologie humaine. **Press Medical Journal**, Marseille, v. 72, n. 10, p. 2913-2915, jun. 1964.

MORRIS, G. K.; FEELEY, J. C. *Yersinia enterocolitica*: a review of its role in food hygien. **Bulletin of World Health Organization**, Genebra, v. 54, n. 33, p. 79-85, sep. 1976.

NASCIMENTO, V.P. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de Salmonella em materiais e produtos de origem avícola. IN: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 7, 2000, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000. 129 p.

NEL, S.; LUES, J. F. R.; BUYS, E. M.; VENTER, P. The personal and general hygiene practices in the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Food Control**, Pretoria, v. 15, n. 7, p. 571-8. mar. 2004.

NICKERSON, J. T., SINSKEY, A. J. **Microbiologia de los alimentos y sus proceso de elaboración**. 2. ed. Zaragoza: Acribia. 1985, 322 p.

NISENGARD & NEWMAN. **Microbiologia oral e Imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 622 p.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, New Castle, v. 86, n. 4, p. 576-82. dec. 1999.

OMS/Organización Mundial de la Salud. Control de la salmonelosis: importancia de la higiene veterinária y de los productos de origen animal. **Série de Informes Técnicos** n.774. 1988.

OTERO, A. et al. Behavior of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C1 or C2 during the manufacture and storage of Burgos cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 117-122, apr. 1987.

PAI, C. H. et al. *Campylobacter gastroenteritis* in children. **Journal of Pediatrics**, Washington, v. 94, n. 14, p. 589-602, mar. 1979.

PAIVA, C.P.; BORGES, R.G.; PANETTA, J.C. Frequencia de quadros gastroentéricos em aeronautas: Pressuposta ligação com toxinfecções alimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 75, p. 13-23, fev. 2000.

PARDI, M. C., SANTOS, I. F., PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 2. ed. Goiânia: UFG, 1993. 623 p.

PEREIRA, M. A. et al. Staphylococci in breast milk from woman with and without mastitis. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 117-120, set. 1995.

PEREIRA, M. L. et al. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo “tipo minas”. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 349-350, jan. 1991.

PETERSON, M. E. et al. Heat pasteurization process for inactivation of nonproteolytic types of *Clostridium botulinum* in picked Dungeness crabmeat. **Journal of Food Protection**. Oregon, v. 60, n. 8, p. 928-934, jul. 1997.

PLANETA. Botulismo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Disponível em: <<http://www.planeta.terra.com.br>>. Acesso em 03 de outubro de 2011.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. Ciencia de la carne y de los producto cárnicos. **Science of meat and meat products**. 5. ed. San Francisco: American Meat Institute Foundation, 1976. 438 p.

RAMPLING, A. et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. **The Lancet**, London, v. 14, n. 23, p. 436-438, apr. 1989.

RAYMAN, M. K. et al. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 41-45, aug. 1975.

REIS, M. H. L., VASCONCELOS, J. C., FABUSI, L. R. Prevalence of enterotoxigenic *E. coli* in some processed raw food from animal origin. **Applied Microbiology**, Miami, v.39, n. 22, p. 270-273, 1980.

RILEY, L.W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D. et al. Hemorragig colits associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, New England, v. 308, n. 11, p. 681-689, jun. 1983.

ROBERSON, J. R. et al. Prevalence of coagulase-positive Staphylococci other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**. Arkansas, v. 57, n. 1, p. 54-58, jan. 1996.

RODRIGUES, D. C. TAUXE, R.V., ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a nem pandemic? **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 105, n. 38, p. 21-27, feb. 1990.

RODRIGUES, D. P. **Ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas no ecossistema água-ostra da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro**. 1983. 118 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1983.

- ROMANOVA, N.; FAVRIN, S.; GRIFFITHS, M. W. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. **Applied and Environmental Microbiology**, Illinois, v. 68. n. 12, p. 6405-6409. jan. 2002.
- ROWE, B. *Salmonella enteritidis* – The problem nationally and internationally, **Journal of Applied Microbiology**, Estocolmo, v. 18, n. 33, p. 623-674, oct. 1989.
- RUDGE, A. C. Determinação de toxinas produzidas pelo *Clostridium perfringens* em produtos cárneos colocados a venda para o consumo humano. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 1, n. 2, p. 110-113, mar. 1982.
- RYSER, E. T., MARTH, E. H. Fate of *L. monocytogenes* during manufacture and ripening of camembert cheese. **Journal of Food Protection**. Chicago, v. 11, n. 50, p. 372-378. oct. 1987.
- SÁ, M. E. P. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 7, n. 2, p. 100-103, mai. 2000.
- SABLÉ, S.; PORTRAIT, V.; GAUTIER, V.; LETELLIER, F.; COTTENCEALI, G. Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. **Enzyme and microbial technology**, New York, v. 21, n. 5, p. 212-220, jan. 1997.
- SANTIAGO, O. Controle microbiológico de qualidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 27, n. 165, p. 26-29, ago. 1972.
- SARAIVA, D. *Clostridium botulinum* tipo C isolado em galinhas em Santa Maria-RS. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 11., 1978, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Microbiologia. Belo Horizonte-MG, 1978. p. 188.
- SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia – Mecanismo das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 520 p.
- SCHWAB JP & EDELWEISS MIA. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 111- 114, out. 2003.
- SERRANO, A. M. **Incidência de *Clostridium perfringens* em alimentos, um surto de intoxicação e evidenciação da prova de lecitinase**. 1976. 112 f. Tese (doutorado em tecnologia de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1976.
- SERRANO, A. M., SCHNEIDER, I. S. **A transmissão e diagnóstico do botulismo**. 5. ed. São Paulo: Abia, 1982. 632 p.
- SERRANO, A. M. Botulismo in Brazil. **Food Control**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 136-138, jul. 1990.
- SHARF, J.M. **Exame Microbiológico de Alimentos**, 4. ed. São Paulo: Polígono, 1972. 258 p.

SHIMONI, E.; LABUZZA, T. P.; Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. **Trends Food Science Technology**, Tennessee, v. 11, n. 11, p. 394-402, apr. 2000.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 103-106, jun. 2000.

SINELL, H. J. **Introducción a la higiene de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1981. 126 p.

SMITH, L. D. S. **Botulismo – El organismo, sus toxinas, la enfermedad**. 2. ed. Zaragoza: Acribia. 1995. 227 p.

STEEG, P. F. T., CUPPERS, H. G. A., HELLEMONS, J. C., RIJKE, G. Growth of proteolytic *Clostridium botulinum* in process cheese products: data acquisition for modeling the influence of pH, sodium chloride, emulsifying salts, fat dry basis and temperature. **Journal of Food Protection**, Chicago, v. 58, n. 10, p. 1091-1099, may 1995.

STERN, N. J.; KOTULA, A. W. Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperature. **Journal of Food Science**, Tennessee, v. 45, n. 8, p. 64-70, jan. 1980.

STERN, N. J. *Yersinia enterocolitica* – Recovery from foods and virulence characterization. **Food Technology**, London, v. 34, n. 36, p. 84-88, jun. 1982.

STUMBO, C. R. Thermobacteriology in food processing. **Academic Press**. New York, v. 13, n. 2, p. 203-213p, oct. 1965.

TESSARI, E.N.C. et al Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 70, n. 3, p. 279-281, mai. 2003.

THORNTON, H. **Compêndio de inspeção de carnes**. 5. ed. São Paulo: Fremag, 1969. 176 p.

TOKARNIA, C. H. et al. Botulismo em bovinos do Piauí. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 13, p. 465-472, ago. 1970.

TOMPKIN, R. B.; CHRISTIANSEN, L. N.; SHARPARIS, A. B. Botulism from meat and poultry products: a historical perspective. **Food Technology**, Ontario, v. 34, n. 5, p. 229, dec. 1980.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4^o edição. São Paulo: Atheneu, 2004. 422 p.

VAUGHN, J.B. et al. *Salmonella* in a modern broiler operation: a longitudinal study. **American Journal of Veterinary Research**, California, v. 35, n. 5, p. 737-741. feb. 1974.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; FOLLY, M. M.; SAHYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n.1, p. 27-31, mar. 2001.

WARD, B. Q., CARROL, B. J. Presence of *Clostridium botulinum* type E in estuarine waters of the gulf of Mexico. **Journal of Applied Microbiology**. Mexico City, v.13, n. 11, p. 68-74, jun. 1971.

YÜCEL, N.; CITAK, S.; ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara Turket. **Food Microbiology**, Ankara, v. 22, n. 3, p. 241-245, may. 2005.

ZHANG, S. X. et al. Functional stability of frozen normal and high pH beef. **Meat Science**, Chicago, v. 69, n. 4, p.765-72, jan 2005.

ZEN-YOJI, H. et al. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia paratuberculosis* from swine, cattleand rats at an abattoir. **Japan Journal of Microbiology**, Tokyo, v. 18, n. 1, p. 103-105, jun 1974.