UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DE ANTISSORO

Parecer
Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Yuko Yoshimoto e aprovada pela Comissão Julgadora em 27.06.94.

YUKO YOSHIMOTO
Bióloga

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA
Orientador

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

JOSÉ LUIZ PEREIRA

(Orientador)

SONIA PRESA CAGGIANI DE SALZBERG

(Membro)

HELIA HARUMI SATO

(Membro)

GLAUCIA MARIA PASTORE

(Membro)

Campinas, 27 de junho de 1994.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll pela efetiva colaboração, suprindo as necessidades de reagentes e linhagens.

À todos aqueles que contribuiram com amizade, compreensão e apoio na realização deste trabalho.

À todos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Rosa e Dona Terezinha que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos.

Ao pessoal da Acecil pela compreensão e apoio na realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Ao Carlos Alberto Tello Sáenz pela constante apoio, carinho, amizade e compreensão.

A entidade CAPES, por seu auxílio financeiro

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço sinceramente à Prof. Dr. José Luís Pereira pela amizade, dedicação, orientação e acima de tudo pela compreensão nos momentos mais difíceis.

Agradeço sinceramente à Norma, pela dedicação, amizade e constante apoio na realização deste trabalho.

Agradeço sinceramente a Profa. Dra. Sonia Salzberg pela amizade e abertura do caminho para prosseguir este trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Gatti do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo fornecimento de técnicas e discussão de procedimentos.

Ao Sr. Manoel Bernardo da Silva do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, que foi imprescindível na realizaçao deste trabalho.

À Elisa Yoko Hirooka pela amizade e apoio para prosseguir na área de pesquisa.

Aos Meus Pais

e Irmãos

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método (modificação do método de Chang e Bergdoll (29)) para a purificação da enterotoxina estafilocócia tipo D (EED); assim como um método de obtenção de antissoro específico, modificação do método recomendado pelo Food Research Institue (FRI). O método proposto de purificação permitiu uma maior recuperação de toxina em relação ao método de Chang e Bergdoll. O método de imunização de coelhos diminui sensivelmente tanto a quantidade de toxina utilizada como o período de inoculação necessário para atingir o valor pico de anticorpos específicos; em relação ao método do FRI.

A enterotoxina foi produzida pela linhagem ***Staphylococcus aureus*** 1151m obtido do FRI incubada em frascos de Fernbach de 2,8 litros contendo o meio caldo de triptona 3%, adicionado de extrato de levedura a 1%, sendo o pH final do meio 6,8. O processo de purificação foi monitorado pelo método de eletroforese vertical em gel e pelos métodos sorológicos de precipitação em gel simples (Oudin) e dupla (Ouchterlony modificado - OSP). O método de eletroforese, através do uso de padrões de peso molecular conhecido permitiu constatar em cada etapa de purificação que a proteína purificada era efetivamente a enterotoxina D. Os métodos de precipitação em gel foram utilizados para a quantificação da toxina juntamente com a determinação de proteína pelo método de Lowry. A primeira cromatografia em Amberlite CG-50 teve um

rendimento de 72%. A modificação da metodologia foi introduzida na segunda cromatografia onde a CM-Celulose foi substituída por CM-Sepharose CL-6B. Nesta etapa o rendimento foi de 46%. A terceira cromatografia em Sephadex G-75, apresentou um rendimento de 77%. O rendimento final de toxina após o processo completo de purificação foi de 25%. Para a obtenção de antissoro específico utilizou-se um grupo de 5 coelhos, inoculados em duas etapas com um total de 100 µg de toxina durante um período de 35 dias. Pelo método do FRI seria gasta uma quantidade maior que 230µg de toxina, e um período de 3 meses, para se atingir o nível máximo de anticorpos. A toxina foi administrado na coxa posterior por via subcutânea em duas etapas, sendo a primeira com adjuvante completo e a segunda, 21 dias após com adjuvante incompleto de Freund. Os animais foram submetidos a sangria branca por punção cardíaca na segunda semana após a ultima injeção - quando o título do soro atingiu valores compreendidos entre 1:16 e 1:32. A atividade imunológica do soro foi monitorada pelo método de OSP que permitiu além da dosagem do anticorpo a determinação da pureza da toxina, evidenciada pelo aparecimento de uma única linha de precipitação em presença do soro polivalente.

ABSTRACT

In this work at was development a new method - modification of the method of Chang and Bergdoll (29) - for de purification of staphylococcal enterotoxin D (SED), and a new method of rabbits immunization for the preparation of specific SED antisserum. The proposed immunization procedure is faster and uses considerably less toxin than the method used by the Food Research Institute (FRI).

The enterotoxin was produced by Strain ***Staphylococcus aureus*** 1151m, from the FRI, incubated in Fernbach flasks of 2,8 liters of capacity, containing tryptone broth 3%, added of yeast extrat to a final concentration of 1%. The medium final pH was adjusted to 6,8. The enteroroxin purification was monitored by vertical gel eletroforesis in the presence of molecular weight standards. This procedure allowed to control each stage of the purification process. On the others side sorological method of the precipitation simple (Oudin) and double (modified Ouchterlony - OSP) allowed to determine toxin concentration. The total protein was determined by the Lowry method. The first chromatography through Amberlite CG-50 had a yield of 72%. The modification introduced in this work was at the second chromatography, where CM-Celulose was substituted by CM-Sepharose CL-6B, and the toxin recovery in this step was 46%. The third chromatography through Sephadex G-75 had a yield of 77%. The total yield of SED

purification was 25%. To obtain the specific antisserum, a lot of 5 rabbits was inoculated, each animal in two steps, with a total toxin concentration of 100 µg, for a total 35 days period. This procedure has the advantage of using less toxin and less time that the procedure recomended in the literature. The antisserum titers are lower than the titers obtained by the traditional methodology, but high enough to be used as reagents for the sorological quantification of the toxin. The toxin was inoculated in the rabbit tight by the subcutaneous route in two steps, in the first injection 50 µg toxin was inoculated with complete Freund adjuvant, and 21 days later, 50 µg of toxin with incomplete Freund adjuvante. The animals were bleeded to death by cardiac puncture on the second week after the second injection or afher the level of antibodies was high enough (above 16) to follow the procedure. The highers titer obtained was 32. The serum titer was determined by the OSP method which allowed also to determine the toxin purity, this one by the appearance of a single precipitation line - against antisserum produced with crude toxin.

ÍNDICE DE ASSUNTOS

RESUMO 1

ABSTRACT 3

ÍNDICE DE ASSUNTOS 5

ÍNDICE DE TABELAS 9

ÍNDICE DE FIGURAS 10

I. INTRODUÇÃO 11

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

II.1 - HISTÓRICO 14

II.2 - REVISÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE 16

II.3 - CARACTERIZAÇÃO DA ENTEROTOXIGENICIDADE 17

II.4 - INCIDÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIGÊNICOS EM ALIMENTOS 20

II.5 - PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS . . . 23

II.6 - ESTRUTURA MOLECULAR 26

II.7 - AÇÃO E DOSE EMÉTICA DAS ENTEROTOXINAS 29

II.8 - REATIVIDADE IMUNOLÓGICA 31

II.9 - ESTABILIDADE DAS ENTEROTOXINAS 34

II.10 - SÍNTESE DE ENTEROTOXINAS 36

II.11 - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS 38

II.12 - PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA 42

II.13 - ANÁLISE DAS ENTEROTOXINAS 46

II.14 - IMUNIZAÇAO 52

III - MATERIAL 54
III.1 - MICRORGANISMO UTILIZADO 54
III.2 - MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA: 54
III.3 - REAGENTES PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS 54
III.4 - REAGENTES PARA ELETROFORESE VERTICAL 54
III.5 - MATERIAIS PARA ANÁLISE DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D 55
III.6 - MATERIAIS PARA PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D 56

III.8 - EQUIPAMENTOS ESPECÍFICOS 57

IV - MÉTODOS 59
IV.1 - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA PARA PURIFICAÇÃO . . 59
IV.2 - MÉTODO DE OSP (Optimum Sensitive Plate) BASEADO NO MÉTODO DE "OUCHTERLONY" MODIFICADO 60
IV.3 - MÉTODO DE "OUDIN" 61
IV.3.1 - PREPARO DO ÁGAR 61
IV.3.2 - REVESTIMENTO DO TUBO 61
IV.3.3 - PREPARO DO ÁGAR-SORO 63
IV.3.4 - PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ANTÍGENO . . . 63
IV.3. - LEITURA DA BANDA DE PRECIPITAÇÃO 64
IV.4 - MÉTODO DE LOWRY PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA 64
IV.4.1 - REAGENTES UTILIZADOS 64
IV.4.2 - CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO 65

IV.5 - PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA D 66

IV.5.1 - TRATAMENTO DA RESINA AMBERLITE CG-50 PARA A 1ª CROMATOGRAFIA 66

IV.5.2 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM AMBERLITE CG-50 67

IV.5.3 - TRATAMENTO DA RESINA CM-SEPHAROSE CL-6B PARA 2ª CROMATOGRAFIA 68

IV.5.4 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE CL-6B 68

IV.5.5 - TRATAMENTO DA RESINA SEPHADEX G-75 69

IV.5.6 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE GEL EM SEPHADEX G-75 70

IV.6 - PRODUÇÃO DE ANTISSORO CONTRA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D 71

IV.6.1 - IMUNIZAÇÃO DE COELHOS 71

IV.6.2 - ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO 72

IV.6.3 - ANÁLISE DE ANTISSORO 72

IV.6.4 - DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO SORO 73

IV.6.5 - PURIFICAÇÃO DE ANTISSORO (IgG) 73

IV.6.6 - ANÁLISE DA PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA OUTRAS PROTEÍNAS DE *Staphylococcus aureus* 75

IV.7 - ELETROFORESE VERTICAL EM GEL SDS (DODECIL SULFATO DE SÓDIO) 76
IV.7.1 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PROTEICAS . . 76
IV.7.2 - PREPARO DA PLACA PARA ELETROFORESE VERTICAL 76
IV.7.3 - PREPARO DO GEL DE SEPARAÇÃO 77
IV.7.4 - PREPARO DO GEL SUPERIOR 77
IV.7.5 - CORRIDA DA AMOSTRA 78
IV.7.6 - REVELAÇÃO DO GEL 79

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO 80
V.1 - PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA 80
V.2 -PRODUÇÃO DE ANTISSORO CONTRA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D 83

VI - CONCLUSÕES 86

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

VIII - APÊNDICE I 126

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - QUADRO GERAL DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. 116

TABELA 2 - ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO 117

TABELA 3 - PESO DOS ANIMAIS (Kg) DURANTE A IMUNIZAÇÃO. 118

TABELA 4 - TÍTULO DOS SOROS APÓS 14º DIA DA ÚLTIMA INJEÇÃO . . 119

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA PELO MÉTODO DE LOWRY 120

FIGURA 2 - CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ENTEROTOXINA D PELO MÉTODO DE OUDIN 121

FIGURA 3 - CROMATOGRAFIA DA ENTEROTOXINA D EM CM-SEPHAROSE CL-6B 122

FIGURA 4 - CROMATOGRAFIA DA ENTEROTOXINA D EM SEPHADEX G-75. 123

FIGURA 5 - CROMATOGRAFIA DO ANTISSORO CONTRA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D APÓS PRECIPITAÇÃO COM $(NH_4)_2SO_4$ 124

FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL SDS. 125

I. INTRODUÇÃO

O estudo de enterotoxinas estafilocócicas é de relevante importância para a efetiva determinação das condições higiênicas dos alimentos susceptíveis ao desenvolvimento de estafilococos enterotoxigênicos, durante os processos de produção, processamento e distribuição dos alimentos.

Linhagens toxigênicas de **Staphylococcus aureus** produzem um grupo de enterotoxinas (EEA, EEB, EEC_1, EEC_2, EEC_3, EED e EEE) que são proteínas de cadeia polipeptídica simples e não ramificadas apresentando um peso molecular de 27.000 a 30.000 daltons. Essas enterotoxinas são semelhantes em sua atividade biológica e composição, apresentando diferenças antigênicas identificáveis sorologicamente pela reação com anticorpos específicos.

A intoxicação alimentar é causada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento. Os sintomas são caracterizados por náusea, vômito e diarréia após 1 - 6 horas de ingestão, ocorrendo em média de 2 - 3 horas. A severidade da intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada pela quantidade de toxina consumida e sensibilidade do indivíduo.

A dificuldade de se determinar a enterotoxigenicidade de estafilococos tem levado a numerosas tentativas para se correlacionar a produção de enterotoxinas com outras propriedades do microrganismo. O método de determinação de coagulase e termonuclease comumente utilizados, indicam apenas a probabilidade da existência de estafilococos enterotoxigênicos. Assim, em casos de surtos de intoxicação alimentar é imprescindível a determinação direta de uma ou mais enterotoxinas no alimento relacionado, uma vez que estas são extremamente resitentes a ação de enzimas proteolíticas e aos tratamentos térmicos, como a pasteurizaçao, o mesmo não ocorrendo com os **Staphylococcus aureus** que apresentam uma baixa resitência térmica.

A eficiência da determinação das enterotoxinas é dependente da sensibilidade e especificidade do método empregado. O método mais comumente utilizado e recomendado pela FDA (Food and Drug Administration) é o ensaio de imunodifusão em microlâmina, que permite a análise de enterotoxina a níveis de 100 ng/mL. Devido a baixa sensibilidade do método, a dificuldade e a demora na sua realização foram desenvolvidos outros métodos como: o método de radioimunoensaio (RIA - Radioimmunoassay) e o método de ensaio imunoenzimático (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay) que oferece uma sensibilidade de 1 ng/mL, sendo a principal restrição ao método de RIA, o fato de utilizar substâncias radioativas. Outro método que apresenta alta especificidade e simplicidade é a técnica de aglutinação em látex passiva e reversa (RPLA) e a sua

sensibilidade de detecção é de 0,5 ng/mL de enterotoxina.

Dentre as enterotoxinas produzidas por linhagens enterotoxigênicas de *S. aureus*, as do tipo A e D são as mais frequentemente envolvidas nos surtos de intoxicação alimentar (51). A quantidade de enterotoxina produzida pela maioria das linhagens específicas é pequena quando comparada com outras enterotoxinas produzidas por outros microrganismos, fato este que dificulta a sua purificação onde são requeridas quantidades na ordem de mg para um bom rendimento.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 - HISTÓRICO

As primeiras ocorrências de doença similar a intoxicação alimentar estafolocócica foi registrada por volta de 1830, porém o microrganismo responsável foi observado somente em 1878 e 1880 por Kock e Pasteur, respectivamente (17). Em 1882, Ogston (83) chamou estes microrganismo de **Staphylococcus**, nome derivado do grego **Staphyle** = cachos de uva e **coccus** = semente, grãos. Rosenbach em 1884 (103) foi provavelmente o primeiro a isolar **S. aureus** de exsudatos purulentos em meio de cultura e estudar suas características no laboratório (8).

O primeiro investigador a associar estafilococos com intoxicação alimentar foi V.C. Vanghan e G. M. Stemberg (33), quando foi relatada uma investigação de numerosos casos da doença em Michigam em 1884, os quais foram atribuídos ao consumo de queijo contaminado com estafilococos. Barber (9) foi o primeiro investigador a demonstrar claramente que os estafilococos eram capazes de causar intoxicação alimentar, como resultado de consumo de leite de vaca mastísticas (17).

A habilidade de algumas linhagens de **S. aureus** causarem intoxicação alimentar em humanos foi reconhecida por Dack et al.

(34) quando administraram a voluntários, filtrado de cultura estéril.

II.2 - REVISÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE

De acordo com a nona edição do Manual de Bergey, a família Micrococcaceae é composta pelos gêneros **Micrococcus, Stomatococcus, Planococcus** e ***Staphylococcus*** (46). O gênero ***Staphylococcus*** é subdividido em 19 espécies e subespécies que se diferenciam dos outros gêneros da família em alguns aspectos como quantidade de guanina + citosina (G + C) do DNA, composição da parede celular e habilidade de crescer e fermentar glicose anaerobicamente. As três espécies de **Staphylococcus** (**S. aureus, S. epidermidis, S. saprophyticcus**) são diferenciados primariamente, com base na habilidade de produzir coagulase, fermentar manitol aerobicamente e anaerobicamente, produzir termonuclease e na composição da parede celular (17).

II.3 - CARACTERIZAÇÃO DA ENTEROTOXIGENICIDADE

Numerosas enzimas e produtos metabólicos são produzidas por células de *S. aureus*. As principais enzimas produzidas por estes microrganismos são coagulase, hialuronidase, fosfatase, desoxirribonuclease, penicilinase, proteases (caseinase, gelatinase, estafiloquinase, fator Müller), lipase, catalase, lisozima e lactato desidrogenase (1).

A produção de coagulase e termonuclease por *S. aureus* tem sido aceito como índice de patogenicidade e enterotoxigenicidade (94) e componente chave para a sua identificação (6), embora nem todas as linhagens de *S. aureus* coagulase positiva sejam capazes de causar intoxicação alimentar (94) e vice-versa (35), sugerindo portanto que a característica de produção de coagulase em estafilococos não possa ser considerada como indicador de enterotoxigenicidade.

Dentre os estafilococos, a espécie **Staphylococcus aureus** é a que predominantemente está envolvida nos casos de intoxicação alimentar, muito embora ***Staphylococcus epidermidis*** (45) e ***Staphylococcus hyicus*** (4) também tenham mostrado capazes de produzir enterotoxinas.

Muitos estudos tem sido realizados para correlacionar a produção de enterotoxinas com outras substâncias produzidas por estafilococos para determinar enterotoxigenicidade, mas até o momento não foi possível determinar qualquer outra característica particular que confirmem esta propriedade (137).

As enterotoxinas são mais termoestáveis que as células de estafilococos, indicando assim que alimentos susceptíveis de provocarem surtos de intoxicação muitas vezes apresentam contagens de células viáveis de ***Staphylococcus aureus*** extremamente baixas ou até mesmo ausência de microrganismo (118). Uma outra enzima extracelular utilizada como indicador indireto da capacidade de linhagens de ***S. aureus*** produzirem enterotoxinas é a desoxirribonuclease termorresitente (65), este fato se deve a correlação da estabilidade térmica entre as duas proteínas (40).

A determinação das enzimas coagulase e desoxirribonuclease termoestável são comumente utilizados conjuntamente para indicar a existência de estafilococos enterotoxigênicos (137). Assim em casos de surtos de intoxicação alimentar é imprescindível a determinação direta de uma ou mais enterotoxinas.

Mais recentemente com os avanços na área de biologia celular muitos outros métodos tem sido aplicados para detectar a capacidade de produção de enterotoxina à partir de linhagens de S. **aureus** isolados de alimentos, entre estes métodos, a hibridização

de DNA para a detecção de genes reguladores da produção de enterotoxinas estafilocócicas de várias linhagens utilizando oligonucleotídeos sintéticos como sondas genéticas, apresentou uma boa correlação entre os resultados obtidos da hibridização e a detecção de toxina pelos métodos imunológico (95%) (55).

II.4 - INCIDÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIGÊNICOS EM ALIMENTOS

A incidência de intoxicação estafilocócica não se encontra bem documentada no mundo inteiro, pelo fato de que não é enfermidade que deva ser relatada compulsoriamente aos serviços médicos e sanitários em muitos países. O que dificulta a obtenção de dados estatísticos para se estabelecer exatamente a taxa de incidência mundial destas enterotoxinas. Na Hungria no ano de 1974, 40% dos casos de intoxicação alimentar foram atribuídos ao consumo de enterotoxinas estafilocócicas, este valor é relativamente alto quando comparado a estatísticas similares no Japão (20 - 25%) e Estados Unidos (25- 30%) (14).

A intoxicação estafilocócica é mundialmente a mais frequente, embora outros agentes etiológicos como ***Salmonella, Clostridium perfringens*** e ***Vibrio parahaemolyticus*** possam prevalecer em alguns países (14).

Um dos fatores que contribuem para ocorrência de intoxicação alimentar é a presença de grande número de portadores de ***S. aureus*** (30 - 50%) que se abrigam na orofaringe e pele (105). Quando estes indivíduos entram em contato direto com o alimento podem

agravar a situação em grandes estabelecimentos como industrias, restaurantes e escolas. Os fatores externos que contribuem para os casos de intoxicação alimentar estafilocócica são as condições de armazenamento de alimento a temperatura inadequada (95,6%) e o segundo fator mais importante é a higiene pessoal (44,6%), seguido por equipamentos contaminados (21,4%) e cozimento inadequado (10,1%) (46).

Reali (96) examinou *S. aureus* isolados das fossas nasais de pessoas sadias e de pessoas com algum tipo de infecção nas vias aéreas superiores e verificou que 82% dos *S. aureus* foram capazes de produzir pelo menos um dos tipos de enterotoxinas A e B ou ambas, sendo que prevaleceu a produção de enterotoxina B (68%).

Em 200 linhagens de *S. aureus* isoladas dos alimentos, Payne e Wood (88) relatou que 62,5% são enterotoxigênicos, sendo que 47,5% produziram enterotoxina A e 3,5% produziram enterotoxina B. Por outro lado, Wieneke (141) observou que 47,7% de linhagens de *S. aureus* isoladas de alimentos cozidos e crús produziam enterotoxina D, 35,1% produziam enterotoxina C e 26,1% de enterotoxina A. Das 113 linhagens isoladas de casos de intoxicação alimentar, 77,9% produziram enterotoxina A, 42,7% enterotoxina D e 40,7% produziram mais de um tipo de enterotoxina (118).

Entre 155 linhagens de *S. aureus* isoladas de alimentos da

Nigéria 67,7% foram de origem humana e 59,4% de origem bovina, sendo que 122 linhagens (78,7%) foram produtoras de enterotoxinas estafilocócica A, B, C, D, ou combinada (2).

Os anticorpos contra as enterotoxinas estafilocócicas podem ser detectados no soro de pessoas sadias e de pessoas que sofreram alguma infecção por *S. aureus*. Jozefcszyk (62) relatou que 22% dos adultos sadios são positivos para anticorpos específicos contra as enterotoxinas estafilocócicas A, B, C_1. O autor também examinou pacientes com septicemia estafilocócica, infecção respiratória e infecção purulenta de pele e constatou que 35,6% eram soro positivos para enterotoxina B e 15,5% para a enterotoxina A

Delazari e Leitão (37) verificaram a presença de *S. aureus* em 69,5% de 128 amostras de macarrão e destas 63% das amostras foram isoladas linhagens enterotoxigênicos com predominância na produção de enterotoxina A em níveis de 31%.

algumas linhagens possam crescer anaerobicamente usando nitrato como aceptor final de elétrons. No processo de fermentação da glicose há formação de ácido lático como produto final predominante(110).

Para o crescimento aeróbio, os estafilococos requerem meio de cultura contendo aminoácidos como fonte de nitrogênio e algumas vitaminas do grupo B (tiamina e niacina) como fatores de crescimento, e para crescimento em condições de anaerobiose requerem uracil e uma fonte de carbono fermentável (7).

Os ***Staphylococcus*** produzem uma variedade ampla de substâncias tóxicas responsáveis pelos processos infecciosos que ocorrem após a entrada do microrganismo no corpo do homens e animais. Estas substâncias são codificadas a nível de genes cromossômicos ou plasmidiais. Entre as mais importantes estão representados por hemolisinas (α, β, γ, δ), leucocidinas, estafiloquinases, hialuronidases, nucleases, proteína A, coagulase, enterotoxinas e várias proteínas associadas a superfícies responsáveis pela adesão da bactéria as células epiteliais do hospedeiro (8).

A parede celular de ***S. aureus*** é constituída de peptideoglicano, glicol ou ribitol, ácido teicoico e proteína A. Na membrana celular contém mono e di-glicosil diglicérides além de fosfolípides como lisil-fosfatidil glicerol e cardiolipina (110).

Os estafilococos produzem pigmento amarelo ou alaranjado sob condições aeróbias em meio contendo alta concentração de cloreto de sódio e leite. Os pigmentos são carotenóides triterpenóides e estão localizados na membrana celular (116).

II.6 - ESTRUTURA MOLECULAR

As enteroroxinas estafilocócicas (EE) são proteínas de cadeia simples não ramificadas, facilmente solúveis em água e em solução salina, apresentam um peso molecular variando de 27.000 a 30.000 D (24; 132). Sete enterotoxinas distintas foram identificadas e diferenciadas de acordo com a sua reação de imunoespecificidade, designadas por letras maiúscula em ordem alfabética: EEA (28), EEB (28), EEC_1 e EEC_2 (18), EEC_3 (97), EED (27) e EEE (19). As enterotoxinas contém relativamente grande quantidade de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina, mas apresentam apenas uma ponte dissulfeto e um ou dois resíduos de triptofano. A enterotoxina D apresenta 2 resíduos de metionina da mesma forma que a enterotoxina A e E mas difere da enterotoxina B e Cs que contém 8 ou 9 resíduos deste aminoácido.

O aminoácido carboxi-terminal para a enterotoxina A é serina (15), lisina para EEB (18, 120) e EED (29), glicina para EEC_1 e EEC_2 (50) e treonina para EEE (23). O aminoácido N-terminal para EEB, EEC_1 e EEC_2 é ácido glutâmico e serina para EEA, EEC_3, EED e EEE.

A digestão de enterotoxina B por tripsina produz duas cadeias peptídicas de baixo peso molecular 17.000 e 11.500 D ligadas através de um ponte de dissulfeto assim como por forças

não covalentes (124). A susceptibilidade da enterotoxina C_1 a tripsina originou três peptídeos de peso molecular 19.000, 6.500 e 4.000 (121). Spero e Morlock (123) observaram que o anticorpo policlonal contra enterotoxina B reage mais fortemente com a cadeia de peso molecular 17.000 D. Os autores também observaram que o anticorpo contra a enterotoxina C_1 purificada também reage mais fortemente com o fragmento de peso molecular 19.000 em relação aos fragmentos de peso molecular 6.500 e 4.000 D. O fragmento maior favorece a probabilidade que um dado epítopo estar contido sobre o peptídeo. Portanto, é provável que devido ao dobramento da cadeia peptídica, o fragmento carboxi-terminal volumoso contenha o epítopo que são acessíveis na toxina nativa, consequentemente induz a resposta imune (123).

O estudo da sequência de aminoácido na enterotoxina B revelou a presença de 239 resíduos com peso molecular de 28.366 D (49). Apenas dois resíduos de cistína estão presentes na enterotoxina B e se localizam aproximadamente no centro da cadeia nas posições 92 e 112 (49). Uma vez que não há grupos sulfidrilas livres na enterotoxina B, as duas meia cisteínas estão unidas (16) formando assim uma alça de cistina. A alça de cistina é uma estrutura aparentemente comum para todas as enterotoxinas, visto que cada uma delas contém somente 2 resíduos de meia cistina, embora a sequência de aminoácidos possa ser diferente para cada enterotoxina.

A sequência parcial de aminoácidos das enterotoxinas A (15), B (49; 60) e C_2 (111) revelou que existe uma área de homologia nas três moléculas. Esta área de homologia tem sido proposta como o sitio ativo da molécula de enterotoxina (50).

II.7 - AÇÃO E DOSE EMÉTICA DAS ENTEROTOXINAS

Os sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica são caracterizados principalmente por vômito e diarréia após 1 a 6 horas após a ingestão de enterotoxina pré-formada no alimento. A enfermidade é aguda e auto limitada, com completa recuperação entre 24 - 72 horas (16).

A sintomatologia da intoxicação alimentar estafilocócica é conhecida, porém seu modo de ação no homem não está bem esclarecida, visto que a doença nunca é fatal, dificultando assim a determinação do efeito destas enterotoxinas nos órgãos através de estudos anatomopatológicos (15).

É conhecido que a ação das enterotoxinas ocorre no trato digestivo, mas alterações como queda de pressão sanguínea e elevação da temperatura corporal também foram notadas, indicando a passagem das enterotoxinas do estômago e trato digestivo para o sistema circulatório (15).

A enterotoxina quando administrada por via intravenosa desaparece rapidamente da circulação sanguínea, onde ocorre a remoção de 60% em 30 segundos (15) e acima de 90% em 1 hora, sendo que 1/3 da dose se localiza no cortex renal após 30 minutos (14).

Estudos indicam que os receptores nervosos do centro do vômito que se encontram nas vísceras abdominais são ativados pelas enterotoxinas estafilocócicas transmitido assim o estímulo através da via vago e nervos simpáticos (15).

O segundo maior sintoma observado em caso de intoxicação alimentar estafilocócica é a diarréia porém esta reação não foi constatada pelo método de alça de íleo ligada em coelhos. O mecanismo de diarréia pode ser atribuído à inibição da absorção da água e/ou aumento do fluxo do líquido transmucoso no lúmem intestinal(15).

Os resultados da análise de alimentos envolvidos em casos de intoxicação alimentar pela presença destas enterotoxinas tem revelado que uma quantidade consideravelmente pequena pode ser suficiente para produzir sintomas em indivíduos sensíveis (15). Em geral, 1 ng de enterotoxina/g de alimento é considerada suficiente para causar intoxicação alimentar (92).

II.8 - REATIVIDADE IMUNOLÓGICA

As enterotoxinas estafilocócicas são classificadas de acordo com as reaçôes sorológicas que apresentam com o anticorpo específico, geralmente produzidos em coelhos. No entanto é sabido que as EEA, EEB, EEC_1, EEC_2, EEC_3, EED e EEE contém um sítio antigênico principal e outro secundário. Sendo assim, cada enterotoxina contém um anticorpo principal específico e um anticorpo secundário comum que reage de forma cruzada com outras enterotoxinas.

As enterotoxinas mais semelhantesentre si são as do grupo C, assim as enterotoxinas C_1 e C_2 reagem com o mesmo anticorpo principal porém cada uma tem seu anticorpo secundário específico (66). A enterotoxina C_3 reage com o anticorpo principal para a enterotoxina C_1 e C_2, mas a reação indica que os sítios antigênicos na enterotoxina C_3 responsáveis por esta reação não são indênticos àqueles das outras enterotoxinas do grupo C (97). Talvez a diferença mais provável é que a enterotoxina C_3 tem serina como resíduo N-terminal, ao passo que a enterotoxina C_1 e C_2 tem ácido glutâmico como resíduo N-terminal porém apresenta serina como o próximo resíduo na sequência de aminoácido (111). O anticorpo produzido contra a enterotoxina B reage de forma cruzada com as enterotoxinas Cs; assim o anticorpo purificado por cromatografia de afinidade reage com as enterotoxinas B, C_1 e C_2 como se fossem

uma única enterotoxina (68).

No caso da enterotoxina E, são observadas reações cruzadas com a enterotoxina A, onde cada toxina tem um anticorpo principal e outro secundário comum, presente nos respectivos antissoros (67). A enterotoxina D não apresenta reação cruzada com anticorpos comuns as enterotoxinas A e E, mas há evidências de que alguns antissoros devam conter anticorpos que reajam com as três enterotoxinas (12). Os anticorpos monoclonais preparados contra enterotoxina A reagem fracamente com enterotoxina B, C e D, mas fortemente com a enterotoxina E quando se utiliza o pelo métodos de ELISA indireto (39).

Spero e seus colaboradores (122) obtiveram reações fortes entre as enterotoxinas B e C e um anticorpo heterólogo; mas a quantidade de soro requerida para a reação é quatro vezes maior do que para a série homóloga. Foi proposto que um dos principais determinantes antigênicos da enterotoxina possui significante similaridade, mas não uma estrutura idêntica. Por outro lado foi impossível de se obter qualquer reação cruzada entre as enterotoxinas A e B. O estudo da reatividade cruzada entre os fragmentos da enterotoxinas B e C_1, obtidas por processo de tripsinização, mostraram que o fragmento maior das duas enterotoxinas, um de 17.000 daltons para a enterotoxina B e 19.000 e 22.000 daltons para enterotoxina C_1, reagiram com anticorpos homólogos para cada molécula de enterotoxina intacta e com menor

frequêcia para a toxina não digerida (122).

II.9 - ESTABILIDADE DAS ENTEROTOXINAS

As enterotoxinas estafilocócicas no estado ativo são resistentes a enzimas proteolíticas como tripsina, quimiotripsina, renina e papaína (16). Com relação a estabilidade das enterotoxinas frente a ação da tripsina, alguns autores mostraram que a atividade da enterotoxina B foi drasticamente reduzida sob a ação de pepsina a valores de pH inferiores a 2,0, assim como a da enterotoxina C_3 (15). As enterotoxinas são resistentes a desidratação, a pH entre 2 e 12 e pode manter ativos em certos alimentos por alguns anos.

As enterotoxinas são consideradas de elevada termo-resistência, fato este comprovado por ensaios biológicos em que a administração via intravenosa em macacos (36) e via oral em humanos (61) de extrato bruto aquecido até a fervura por 30 minutos induzem o surgimento de sintomas típicos.

Alguns autores tem descrito o efeito de aquecimento sobre a estabilidade da enterotoxina estafilocócica e Schwabe et al. (112) observaram que com o aquecimento das enterotoxinas estafilocócicas em solução de tampão fosfato de sódio a pH 7,2 foram recuperados parcialmente a enterotoxina A (65%) e B (39%) após aquecimento a 100^0 e 80^0C por 10 minutos, respectivamente.

Schwabe et al (112) observaram que com o aquecimento de extrato de alimento contendo enterotoxina estafilocócica, a toxina se liga de modo mais ou menos reversível com certos componentes do extrato. Os autores observaram que a enterotoxina estafilocócica que perdeu a atividade biológica e sorológica após aquecimento pode ser reativado pelo tratamento a pH alcalino (pH 10 -11) por dissociação da enterotoxina ligada, recuperando-se a sua atividade biológica.

Alguns autores observaram que as enterotoxinas A (119) e B (54) perdem a atividade imunológica mais rapidamente após o aquecimento das toxinas em tampão fosfato ou acetato a baixa temperatura quando comparado a alta temperatura. Jamlang e seus colaboradores (54) observaram que isto ocorre devido a agregação da enterotoxina B a baixa temperatura e esta pode ser reversível com a elevação da temperatura.

Read e Bradshaw (95) estudou o efeito da irradiação sobre enterotoxina B e relatou que uma dose de 5 e 20 Mrad foi necessária para a redução de 97% da atividade de enterotoxina B em tampão veronal e leite, respectivamente.

II.10 - SÍNTESE DE ENTEROTOXINAS

As evidências acumuladas indicam que a síntese de enterotoxinas pode ser controlado geneticamnente por via plasmidial ou cromossômica. A produção de enterotoxina B e D é controlada geneticamente por plasmídeos, mas algumas vezes a enterotoxina B pode estar associado a genes cromossômicos e a sua produção neste caso ocorre principalmente no final da fase estacionária. As enterotoxinas A e E são controladas por genes cromossômicos e a sua produção ocorre durante a fase logarítmica do crescimento (8)

A adição de fonte de carbono rapidamente metabolizável como glicose ou piruvato ao meio de caseína hidrolisado reprime a síntese de enterotoxina devido a produção de ácido durante o seu metabolismo e consequentemente queda no pH (78; 81). Vários estudos realizados mostraram que condições favoráveis a descarboxilação oxidativa do piruvato favorecem a repressão na síntese da enterotoxina B (78). Muitos pesquisadores (78; 80; 81) sugeriram que a síntese de enterotoxina seja controlada por mecanismos de regulação catabólica, por outro lado, este fato apresenta contradições, visto que a adição de um análogo a glicose não metabolizável como 2-deoxiglucose (2-DOG) apresenta efeito inibitório, enquanto que o metil glicosídeo (α-MG) apresenta um

efeito estimulador sobre a produção de enterotoxina. A adição de Adenosina 3',5' monofosfato (AMPc) não revertem a repressão da glicose ou do 2-deoxiglucose na síntese de enterotoxina. Através destes estudos, os pesquisadores sugerem que AMPc não está envolvido como intermediário de glicose ou repressão catabólica na síntese de enterotoxinas (38, 84, 52, 93).

II.11 - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS

Muitas alterações tem sido propostas na composição dos meios de cultura para produção de enterotoxinas desde os primeiros estudos de Dack et al. (34).

A escolha do meio de cultura adequado é uma consideração importante na produção de enterotoxina. É desejável a escolha de um meio simples, como componentes de baixo peso molecular e facilmente dializável, quando se trata de estudos de purificação de enterotoxinas. Estas carcterísticas são levadas em consideração com a finalidade de eliminar substâncias interferentes no processo de separação de enterotoxinas. Outro fator importante é a escolha do meio de cultura capaz de estimular a produção de enterotoxina em grande concentração (15).

Para a produção e purificação de enterotoxinas em grande escala tem sido empregado meio N-Z Amine NAK e digerido pancreático de caseína, combinado ou não como o meio PHP (Protein Hydrolisate Power) e suplementado com niacina, tiamina e glicose (126). A adição destas vitaminas (tiamina e niacina) é essencial para o crescimento de estafilococos, porém estas podem ser substituídas pela adição de extrato de levedura (75). O meio N-Z Amine NAK é recomendado para produção e purificação de enterotoxina, porém este meio deixou de ser comercializado, sendo

assim foram substituídos por 1% de tripticase suplementado com 1% de extrato de levedura (73) e BHI (70).

A adição de glicose no meio resulta na inibição da produção de enterotoxina, devido a diminuição do pH, acarretados pela produção de produtos metabólicos da glicose (38). A produção de enterotoxinas em níveis mais elevados foram conseguidos em meios tamponados com pH superior a 5,6 (87, 91). Metzger et al. (75) sugeriram a adição 0,2% de glicose ao meio para aumentar a produção de enterotoxina B.

A faixa de temperatura para produção de enterotoxina está em média entre 10 - 46°C com um ótimo de 35 a 45°C para enterotoxina A, B, C e D, variando com a linhagem de *S. aureus*, meio de cultura, pH, grau de aeração (129). Pereira et al. (90) reportaram 39,5°C como temperatura ótima para produção de enterotoxina A e B em cultura líquida, embora estas linhagens possam produzí-las até 45°C ainda que em taxas reduzidas. A quantidade de enterotoxina sintetizada por *S. aureus* decresce consideravelmente com a diminuição da temperatura, não sendo possível detectá-la a 10° C (136). O resultado de vários estudos sugerem que a temperatura ótima para a produção de enterotoxina seja um pouco superior que para o crescimento, no entanto, a mudança de temperatura afeta a síntese de enterotoxina mais fortemente que o crescimento do microrganismo.

Muitas linhagens de estafilococos crescem a valores de pH entre 4,5 e 9,3 com o seu ótimo entre 7,0 - 7,5. O valor do pH mínimo que permite a síntese de enterotoxina A, B, C_2 e E em meio BHI tamponado foi em média de pH 4,9 e em condições de anaerobiose o pH foi de 5,7 para enterotoxina A, B , C_2 e pH 6,0 para enterotoxina E (10) . Scheusner e Harmon (109) relataram que as enterotoxinas A, B, C e D foram produzidas em vários alimentos que apresentavam pH inferior a 5,0.

O tipo de acidulante empregado para ajustar o pH dos alimentos afeta a síntese de enterotoxina de formas diferentes. Segundo Tatini et al. (130) quando o pH do leite foi ajustado para 4,5 - 6,4 com ácido clorídrico a enterotoxina A foi produzida em todos os níveis de pH. Por outro lado, quando foi ajustado com ácido lático, o crescimento e formação de enterotoxina não ocorreu a pH 4,5, no entanto a produção de enterotoxina foi evidente a pH≥5,0. Os estafilococos variam na sua sensibilidade para diferentes ácidos, por exemplo em um mesmo pH, o ácido acético é mais bactericída que ácido cítrico, ácido lático e ácido tartárico (82).

A adição de sais como cloreto de sódio resulta na diminuição da atividade de água (aw) no meio de cultura. A adição de glicerol para controlar a atividade de água, resultou na produção de enterotoxina a aw mínima entre 0,89 e 0,99 (134). No entanto, quando o cloreto de sódio foi usado, a aw mínima foi entre 0,90 e

0,92 e a mistura de NaCl, KCl e Na_2SO_4 permite a produção de enterotoxina a aw<0,90 (135).

Os estafilococos são capazes de crescerem e produzirem enterotoxinas na presença de cloreto de sódio em seu meio de cultura a níveis de 0 a 20% e 0 a 10% respectivamente, sendo que o crescimento do microrganismo e a produção de enterotoxina é ótimo na ausência de sal (72).

A adição de íons Fe^{++} ao meio de crescimento estimulou a síntese de enterotoxina, mas não influenciou a produção de enterotoxina A e C (77). O aumento nos níveis de íons Mg^{++} (de 0,4 para 1,5 mM); PO_4^{---} (de 1,44 para 2,87) ou K^{+} (de 1,5 para 30 mM) em meio definido quimicamente resultou em aumento de aproximadamente 100% na produção de enterotoxina (64). A adição de KNaF inibe a síntese de enterotoxina, mas este efeito pode ser revertido pela adição de Mg^{++} devido ao requerimento desse íon para controle do sistema enzimático na síntese de enterotoxina (15).

O crescimento e produção de enterotoxina por *S. aureus* são influenciados por vários fatores ambientais e nutricionais, como os já citados além de tamanho do inóculo, composição atmosférica e fontes de carbono e nitrogênio (118).

II.12 - PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA

A purificação das enterotoxinas é necessária para revelar a exata natureza destes componentes (29) . A principal intenção de se determinar a natureza das enterotoxinas visa a aplicação destes conhecimentos no desenvolvimento de testes específicos para sua análise qualitativa e quantitativa.

Uma vez que as enterotoxinas são imunologicamente distintas entre si, a única forma de identificação possível é através de sorologia e para tanto são necessários preparações com elevado grau de pureza no desenvolvimento das metodologias (117).

A purificação da primeira enterotoxina (EEB) foi descrita em 1959 por Bergdoll e seus colaboradores (20), consistia na precipitação ácida da enterotoxina presente em sobrenadante da cultura de *S. aureus* S-6, adsorção sobre alumina, precipitação alcoólica, seguida por cromatografia em resina Amberlite IRC-50 e eletroforese em gel de amido.

O método de precipitação ácida foi abandonado devido a desnaturação parcial da toxina por ácido clorídrico, tornando-se um procedimento indesejável.

As enterotoxinas foram primeiramente purificadas no

laboratório do FRI (Food Research Institute). As enterotoxinas A (30), B (17), C_1 (22), C_2 (5), C_3 (97), D (29) e E (23) foram purificadas baseando-se inicialmente no método de Schantz et al. (107) desenvolvido para purificação de enterotoxina B, na qual envolve as etapas de absorção da enterotoxina em resina Amberlite CG-50, troca iônica em carboximetilcelulose e filtração em gel. Estes métodos sofreram algumas modificações, como a utilização de resina ácido carboxílico CG-50, carboximetilcelulose, hidroxilapatita e filtração em gel Sephadex-G75 para purificaçao de EEA (108). Enterotoxina A e C_1 com elevado grau de pureza foi obtida por cromatografia em QAE Sephadex A-50 (102). Para purificação de EEB, Johansson et al. (56) usou Sepharose "Fast Flow" como um trocador iônico e Sephacryl S-200 HR para filtração em gel obtendo assim um fluxo elevado, necessáro para purificação de grandes quantidades de enterotoxinas. Neste método foi obtido enterotoxina de alta pureza (99%) e rendimento de 50 a 60%.

As enterotoxinas apresentam diferenças nos seus pontos isoelétricos, o que permite a utilização de métodos de focalização isoelétrica para a purificação de enterotoxinas em pequenas quantidades (101, 74) em combinação com cromatografia em resina de troca iônica (Amberlite CG-50)(43, 41) e filtração em gel. Este método tem sido aplicado para purificação de enterotoxina B, C_1 (41) e D (69).

O método de purificação de enterotoxina D desenvolvido por

Chang e Bergdoll (29) consiste na remoção da toxina do sobrenadante de cultura com o trocador iônico resina Amberlite CG -50, seguida por dupla cromatografia em CM-celulose e filtração em gel de Sephacryl G-75 (2 vezes).

O procedimento de cromatofocalização desenvolvido por Lei et al. (69) para purificação de enterotoxina D consite na adsorção da toxina em resina Amberlite CG-50 seguido por cromatofocalização do eluído em Polybuffer Exchanger 94 (Pharmacia) e filtração em gel de Sephacryl S-200 (Pharmacia), obtendo-se uma toxina altamente purificada e um rendimento de 15,5%. Esta técnica é cara e não pode facilmente ser adaptada para purificação em grande escala (98).

Willians et al (142) utilizaram o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography) para purificação de enterotoxina B. Os autores obtiveram a enterotoxina contaminada com proteínas de baixo peso molecular que foram separadas pela desnaturação da proteína com sulfato dodecil de sódio-glicero-mercaptoetanol. Posteriormente Strickler et al. (126) desenvolveu um método rápido para purificação de enterotoxinas empregando HPLC de fase reversa e posteriormente recromatografia por HPLC de troca iônica, obtendo-se uma recuperação de aproximadamente 50%.

Recentemente, um procedimento simples para purificação de

enterotoxina A foi descrito por Reynolds et al. (98). O método consiste na utilização de cromatografia ligada a corante, na qual o corante sintético triazina "Red A" é acoplado a matriz suporte de agarose. O uso de cromatografia de afinidade ligado a corante tem sido extendido para purificação das enterotoxinas A, B e C_1 em larga escala (24). Este método de purificação não tem sido publicado até o presente momento para purificação de enterotoxina D e E.

Shinagawa et al.(114) propuseram um processo de purificação para enterotoxina D utilizando o método de cromatografia de imunoafinidade. O imunoadsorvente é obtido pela adsorção de anticorpo monoclonal purificado de alta reatividade e especificidade à fase estacionária Affi-Gel 10. Posteriormente, a enterotoxina bruta é ligada ao imunoadsorvente e a eluição é realizada com ácido acético contendo cloreto de sódio, obtendo-se uma alta recuperação (70%).

Todas as enterotoxinas podem estar envolvidas no caso de intoxicação alimentar, porém a enterotoxina A tem sido envolvida na maioria dos casos, e a enterotoxina D é a segunda mais frequente. Esta última que apresenta maior dificuldade na purificação, devido à produção em quantidade muito pequena ao redor de 1 µg/mL (46) em comparação com as demais que apresentam uma produção aproximada de: 100-200 µg/mL (EEB), 10-60 µg/mL (EEA), 60 µg/mL (EEC) e 3-5 µg/mL (EEE) (133).

II.13 - ANÁLISE DAS ENTEROTOXINAS

Uma das áreas mais ativas no campo de estudo das enterotoxinas é o desenvolvimento de métodos de análise sensíveis e específicos e de fácil aplicação.

Das substâncias ativas biologicamente produzidas por estafilococos, somente as enterotoxinas causam emesis quando administradas por via oral (127). Desta forma, o método biológico proporciona o bioensaio mais confiável para a detecção de enterotoxina.

O uso de macaco Rhesus (**Macaca mulata**) jovem de aproximadamente 2 a 3 Kg mostra-se o melhor ensaio biológico para a análise das enterotoxinas. Este método é realizado administrando-se aproximadamente 50 mL de extrato de cultura livre de células através de sonda via intragástrica. Os animais são observados por 5 horas após alimentação e o sintoma de vômito é aceito como reação positiva para confirmar a presença de enterotoxina na amostra (21).

O elevado custo dos animais e a dificuldade na manutenção e manuseio destes, somado ao fato de que os animais podem adquirir resistência as enterotoxinas após vários ensaios, limitou o seu

uso para teste de rotina pelos diferentes laboratórios (3).

O teste mais sensível e específico para caracterizar e determinar a enterotoxina estafilocócia baseia-se na reação com o anticorpo específico, demonstrada pela reação de precipitação específica em gel (12).

O teste de imunodifusão simples de Oudin (87) é o método utilizado para análise quantitativa de enterotoxina (13) em sobrenadante de cultura. Este método é de grande importância na quantificação de enterotoxina nas diferentes fases de purificação e determinação do título dos antissoros, apresenta uma sensibilidade de 1 a 2 µg/mL de enterotoxina (15).

No método de dupla difusão em gel, a modificação da técnica de Ouchterlony (86) para placas de ótima sensibilidade (OSP) por Robbins et al. (100) é utilizado para determinação de enterotoxina em amostras desconhecidas e sua sensibilidade limite é de 0,5 µg/mL de enterotoxina permitindo portanto a análise de apenas de sobrenadante de culturas. Quando emprega-se a técnica de microlâmina modificado por Wadsworth (138)] a sua sensibilidade estende-se para 0,1 µg/mL, porém não é utilizado com frequência, ainda que recomendado pelo FDA (26), devido a dificuldade de se estabelecer e obter resultados satisfatórios, além de despender de um período longo de análise (15).

No método de hemaglutinação proposta por Morse e Mah (79), os eritrócitos de carneiro tratados com formol são posteriormente tratados com ácido tânico e sensibilizado com enterotoxina. No método de Johnson et al. (59), a enterotoxina é acoplada aos eritrócitos com benzidina bisdiazotada. Ambos os métodos baseiam-se na aglutinação de células sensibilizadas com enterotoxina na presença de anticorpos específicos. A sensibilidade destes métodos é de aproximadamente 1,5 ng de enterotoxina/mL. A limitação deste método reside no fato de que algumas culturas de estafilococos produzem hemaglutininas que dificultam a sensibilização dos eritrócitos (59) além de poder sofrer interferência por impurezas presentes no extrato bruto de alimento. Salomon e Tew (104) modificaram esta técnica pela substituição de eritrócitos de carneiro por partículas de látex sensibilizado com anticorpo específico e denominaram de método de aglutinação em látex passiva reversa (RPLA) e a sua sensibilidade de detecção é cerca de 0,5 ng/mL de enterotoxina aproximadamente. Este método apresenta algumas vantagens como alta especificidade e simplicidade na realização do teste, além de não requer procedimentos complicados ou equipamentos de elevado custo (53, 89).

Na técnica de hemaglutinação passiva reversa (115) os eritrócitos de carneiro preservados com formalina são tratados com ácido tânico antes da sensibilização com antienterotoxina. A seguir, a solução de enterotoxina é tratado com os eritrócitos

sensibilizado e o grau de aglutinação é determinado após 2 horas. Neste método foi possível se detectar concentrações na ordem de 1,5 ng/mL de enterotoxina.

Outra técnica proposta para detecção de enterotoxinas é o uso de anticorpos fluorescentes (47). O princípio baseia-se na formação do complexo enterotoxina-antienterotoxina conjugado com isotiocianato de fluoresceína. Este método apresenta sensibilidade de 0,05 µg/mL e 0,1 µg/mL segundo Genigeorgis e Sadler (47) e Bergdoll (15), respectivamente.

Um método sensível e confiável para análise de enterotoxina no alimento é o radioimunoensaio (RIA - Radioimmunoassay) (32, 31, 57,58). Esta técnica é baseada na adsorção de anticorpo específico na superfície de tubos de poliestireno e habilidade deste anticorpo ligar-se competitivamente entre enterotoxina marcada com I^{125} e não marcada. A sensibilidade deste método varia entre 1 a 5 ng/mL (57,58) sem concentração do extrato da amostra. A grande desvantagem deste método é a utilização de substâncias radioativas (I^{125}) fato que requer um laboratórios específicos e infra-estrutura tendo em vista os riscos à saúde humana, além do elevado custo de equipamentos.

Com o intuito de eliminar a utilização de materiais radioativos, foi proposto o método de ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (106). O princípio

baseia-se em uma reação enzimática com produtos coloridos para se detectar a ocorrência da reação antígeno-anticorpo específico. Existem pelo menos três versões para o método de ELISA, entre os quais são método competitivo (63) , método de "Sandwish" simples (106) e método de "Sandwish" duplo (11).

No método competitivo, as esferas de poliestireno são cobertas individualmente com os anticorpos específicos para as enterotoxinas (125). Este método permite uma detecção de aproximadamente 0,1 ng/mL de enterotoxina.

Na técnica de "Sandwish" simples de ELISA, as esferas de poliestireno são revestidas com os anticorpos específicos e, a seguir são adicionados os extratos de amostras contendo enterotoxina e posteriormente, os anticorpos específicos conjugados a uma enzima. Entre cada passo, o excesso de reagente é removido por lavagem. Finalmente o substrato é adicionado e o produto cromogênico é formado pela ação da enzima. No caso de análises quantitativas, a reação colorida é medida espectrofotometricamente, necessitando-se neste caso uma curva padrão construída previamente com valores conhecidos de enterotoxina (44, 106).

No método de "Sandwish" duplo, a fase sólida de poliestireno é recoberta com o anticorpo específico e posteriormente adicionado a solução amostra contendo enterotoxina. O anticorpo específico

conjugado com enzima é preparado separadamente e adicionado para verificar a captura do antígeno. Após um periodo de incubação, a substância cromogênica é adicionada e a análise quantitativa é determinado espectrofotometricamente. A quantidade do segundo anticorpo ligado na reação é diretamente proporcional a quantidade de enterotoxina (117)

As enzimas frequentemente utilizadas no preparo de conjugado são peroxidase ou fosfatase e seus substratos podem ser 3,3'-azino-di (3-etil benzoatizola sulfonato) (Sigma, ABTS) e p-nitro fenol fosfato, respectivamente.

O desenvolvimento do método de detecção de enterotoxina estafilocócica estafilocócica no extrato de alimento pela combinação de reação com anticorpo específico e eletroforese é adequadamente sensível (10 ng de enterotoxina) e rápido (4 - 5 horas). Neste método as proteínas são detectadas pela reação com anticorpo específico e pela determinação de peso molecular, e o resultado falso-positivo é virtualmente impossível (85)

II.14 - IMUNIZAÇAO

Como mencionado anteriormente, as enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular , alta toxicidade e relativamente baixa antigenicidade. Estas características dificultam o processo de imunização, uma vez que concentrações elevadas de toxina resultam na morte do animal e concentrações muito baixas tornam o animal imunotolerante.

A preparação de anticorpo específico tem sido feita principalmente em coelhos embora outros animais como macacos e cavalos tenham sido já utilizados. Tem sido proposto pelos pesquisadores do FRI (20) uma série inicial de 16 inoculações sendo que 8 delas utilizam enterotoxina formalizada com 0,4% de formalina a 30°C e administradas num intervalo de 18 dias e as doses restantes são feitas com a toxina não tratada. Apenas a primeira injeção foi realizada na presença de Adjuvante de Freund sendo testadas 5 vias, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutânea e intravenosa.

O método proposto por Casman e Bennett (25) consiste na injeção de enterotoxina B em coelhos com intervalos semanais como segue: 1 -2 µg de enterotoxina por via subcutanea e a seguir 5, 50, 100 1.000 e 2.500 µg misturado em solução de fosfato de alumínio subcutaneamente. Após 3 semanas, 4.000 µg de

enterotoxina B foram administrados intravenosamente, após 1 semana, o título do anticorpo mostrou-se suficientemente alto. Doses de 1.000 µg de enterotoxina foram administradas mensalmente por 4 meses.

O método de imunização desenvolvido por Robbins e Bergdoll (99) consiste na utilização de esquemas diferentes para cada tipo de enterotoxina. A primeira dose é realizada com uma quantidade muito pequena de enterotoxina (1 - 2 µg), quantidade esta que depende da toxicidade de enterotoxina. As sucessivas injeções foram aumentadas até gradativamente concentração de aproximadamente 0,5 mg de enterotoxina.

O método de produção de anticorpos específicos contra enterotoxinas A e B desenvolvido por Morissete et al. (76) consistiu na formação do complexo antígeno-anticorpo para minimizar o efeito tóxico da toxina em animais, visto que o complexo formado não prejudica na produção do anticorpo.

III - MATERIAL

III.1 - MICRORGANISMO UTILIZADO

Staphylococcus aureus 1151m (mutante) produtor de enterotoxina D, fornecido pelo Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll (Food Research Institute, Wisconsin - EUA).

III.2 - MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA:

Meio caldo de Triptona (Difco) 3% suplementado com Extrato de Levedura (Difco) 1% a pH 6,8, esterilizado a 121^0C / 15 minutos.

III.3 - REAGENTES PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

- Reagente para Fenol Folin Ciocalteau (QEEl)
- Sulfato de cobre pentahidratado (Ecibra)
- Tartarato duplo de sódio e potássio (QEEl)
- Hidróxido de sódio (Merck)
- Carbonato de sódio (Sigma Chemical Company)
- Albumina de soro Bovino (Sigma Chemical Company)

III.4 - REAGENTES PARA ELETROFORESE VERTICAL

- Acrilamida (BDH Biochemicals)
- Bisacrilamida (Sigma Chemical Company)
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Bio-Rad Laboratories)

- Tetra etil metil diamino (TEMED) (Merck)
- Tris hidroxi metil amino metano (Nutricional Biochemicals Corporation)
- Persulfato de amônio (Ecibra)
- Ácido Clorídrico (Merck)
- Glicina (BDH Biochemicals)
- Coomasie Blue R-250 (Difco)
- Metanol (Merck)
- Ácido Acético (Merck)
- Glicerol (Ecibra)
- 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Company)

III.5 - MATERIAIS PARA ANÁLISE DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D

- Enterotoxina estafilocócica tipo D, fornecido pelo Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll
- Soro anti-enterotoxina estafilocócica tipo D, fornecido pelo Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll.
- Ágar Nobre (Difco)
- Tris hidroximetil amino metano (Nutricional Biochemicals Corporation)
- Molde acrílico para OSP ("Optimum Sensitive Plate"), modelo FRI, para análise em dupla difusão em gel.

III.6 - MATERIAIS PARA PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D

- Coluna para cromatografia C 26/40 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Piscataway, N.J.)
- Coluna para cromatografia C 16/40 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Piscataway, N.J.)
- Coluna para cromatografia 16/100 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Piscataway, N.J.)
- Bequer de 15 litros
- Resina Amberlite CG-50, 100 - 200 mesh (Mellinckrodt Chemical Works).
- Resina Carboximetil Sepharose CL - 6B (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Piscataway, N.J.).
- Resina Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Piscataways, N.J.).
- Sacos de diálise (VWR Scientific Inc.).
- Polietilenoglicol 20.000 (Sigma Chemical Company).

III.7 - MATERIAIS PARA IMUNIZAÇÃO E SANGRIA DOS COELHOS

- Enterotoxina estafilocócica tipo D purificado no laboratório de Toxinas Microbianas, Departamento de Ciências de Alimentos/Faculdade de Engenharia de Alimentos
- Adjuvante de Freund completo (Difco)
- Adjuvante de Freund incompleto
- Seringa de 3,0 mL, com Lower-Lok
- Seringa de 50,0 mL
- Coelhos branco da raça Nova Zelândia (Machos)

III.8 - EQUIPAMENTOS ESPECÍFICOS

- Incubador "Shaker" com temperatura controlada, modelo G-25 e G-24, New Brunswick Scientific Industries Co. Inc.
- Espectrofotômetro U.V. Micronal Modelo B-382
- Potenciômetro de pH, Corning Digital 110 de escala expandida em resolução de 0,01.
- Banhos termostático de temperatura controlada "Fanen" .
- Câmara incubadora para BOD, modelo 347 "Fanen"
- Bomba de ultrafiltração tangencial, Pellicon
- Liofilizador de bandeja, modelo LK-4, Edwards do Brasil.
- Balança semi-analítica digital BEC 1000, Acatec
- Balança analítica Mettler H 35
- Coletor de frações FRAC-100 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Pistacotaways, N.J.)
- Registrador REC-481 (Pharmacia Fine Chemicals, INC,

Pistacotaways, N.J.)

- Monitor de luz Ultra Violeta UV-1 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Pistacotaways, N.J.)
- Bomba peristáltica P-1 (Pharmacia Fine Chemicals, INC, Pistacotaways, N.J.)
- Bomba de filtração tangencial Pellicon (Millipore)
- Membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,25 µm (Millipore)
- Agitador Magnético (Fisaton)
- Paquímetro (Mitutoyo).
- Fonte PS 500 XT DC Power Supply, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco
- Cuba para eletroforese vertical

IV - MÉTODOS

IV.1 - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA PARA PURIFICAÇÃO

Em frascos Fernback de 2,8 litros foram colocados 600 mL de meio de cultura caldo de triptona 3% adicionado de 1% de Extrato de levedura e esterilizados a 121°C por 15 minutos. O meio foi inoculado com 1% de cultura de *S. aureus* 1151m de 24 horas, crescidas no mesmo meio. Os frascos foram incubados a 37°C durante 24 horas sob agitação de 150 rpm.

Para a remoção das células, a cultura foi filtrada em unidade de filtração tangencial Pellicon - Millipore através de membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,25 µm de diâmetro.

O sobrenadante da cultura foi diluído com 4 volumes de água destilada e o pH ajustado a 5,6 com solução de ácido clorídrico 6N.

IV.2 - MÉTODO DE OSP (Optimum Sensitive Plate) BASEADO NO MÉTODO DE "OUCHTERLONY" MODIFICADO (86)

O método de dupla difusão em gel foi utilizado para análise qualitativa e semi-quantitativa de enterotoxina. Para o procedimento foram utilizados placas de "Petri" de 50 mm de diâmetro recobertas com 4,0 mL de ágar nobre 1,2% em tampão Tris 0,05 M pH7,4 contendo 0,85% de cloreto de sódio e filtrado a quente através de papel de filtro Whatman no 2, com auxílio de funil de Buchner e bomba à vácuo.

Após a solidificação, o ágar foi perfurado com o auxílio de um molde de acrílico padronizado pelo FRI (100).

O orifício central foi preenchido com antissoro diluído a 1:8, nos dois orifícios laterais menores foi adicionada enterotoxina estafilocócica tipo D padrão na concentração de 4 µg/mL e nos orifícios laterais maiores foram adicionadas as amostras a serem testadas.

Para o desenvolvimento da reação, as placas de "Petri" assim preparadas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 24 horas. A câmara úmida foi preparada em placa de "Petri" de 250 x 25 mm com algodão umedecido em água destilada.

Após incubação, as placas foram observadas sobre fundo opaco

com luz indireta e difusão com auxílio de lupa para facilitar a visualização das linhas de precipitação.

Um aumento na nitidez das linhas de precipitação foi obtido após a adição de 2,0 mL de solução de ácido fosfórico 0,1 M.

IV.3 - MÉTODO DE "OUDIN" (139, 140)

IV.3.1 - PREPARO DO ÁGAR

Ágar nobre na concentração de 0,6% foi fundido em tampão Tris 0,05M pH7,4, a seguir filtrado a quente através de papel de filtro Whatman nº 2 com auxílio de bomba à vácuo. O ágar preparado foi estocado sob refrigeração em tubos de rosca. Quando necessário foi fundido em banho de água em ebulição.

IV.3.2 - REVESTIMENTO DO TUBO

O ágar preparado no ítem anterior foi utilizado para revestimento dos tubos de 4,0 mm de diâmetro. Para isto, foi realizado preenchimento e esvaziamento rápido do tubo com o ágar com o auxílio de uma seringa de 1,0 mL com agulha de anestesia raquidiana de 100 x 15 mm, a seguir os tubos foram colocados imediatamente em banho de gelo.

Os tubos assim preparados foram colocados em dessecador durante pelo menos 24 horas. No momento do uso, os tubos que apresentavam manchas brancas sobre as paredes foram descartados.

BIBLIOTECA CENTRAL

IV.3.3 - PREPARO DO ÁGAR-SORO

O soro diluído para 1:16 em tampão Tris 0,05M pH7,4, foi colocado em banho de água a 48°C. Igual volume de ágar fundido e resfriado a 48°C foi adicionado ao soro, obtendo-se uma diluição final de 1:32. Os tubos revestidos com ágar foram preenchidos com aproximadamente 0,3 mL da solução ágar-soro, com auxílio da seringa utilizada para revestimento, evitando-se o escorrimento da solução pelas paredes do tubo, assim como a formação de bolhas de ar. A seguir os tubos foram colocados rapidamente em banho de gelo.

IV.3.4 - PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ANTÍGENO

A enterotoxina estafilocócica padrão foi diluída em tampão Tris 0,05M pH7,4 nas seguintes concentrações 64; 32; 16; 8; 4; 2 µg/mL.

Um volume de aproximadamente 0,3 mL de antígeno foi adicionado a cada tubo contendo ágar-soro. Os tubos foram selados com filme plástico e incubados a 25°C durante 7 dias.

IV.3. - LEITURA DA BANDA DE PRECIPITAÇÃO

Após o período de incubação, o comprimento da banda de precipitação (mm) foi medido com auxílio de um paquímetro e com os dados obtidos construiu-se uma curva padrão relacionando concentração de antígeno e comprimento da banda de precipitação.

IV.4 - MÉTODO DE LOWRY PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (71)

A reação de Lowry consiste na formação de complexo cobre-proteína em solução alcalina. Este composto reduz o reagente fosfomolibdico-fosfotungstato apresentando uma cor azul intensa.

IV.4.1 - REAGENTES UTILIZADOS

A - 1,0 g de Na_2CO_3 em 100 mL de NaOH 0,1N

B - $CuSO_4.5\ H_2O$ 1%

C - Tartarato de Sódio e Potássio 2%

D - Misturar 100 mL de A + 1,0 mL de B + 1,0 mL de C

E - 1 parte de reagente de Folin + 2 partes de água destilada

IV.4.2 - CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO

A partir de uma solução de 300 µg/mL de Albumina de soro bovina, foram pipetados cuidadosamente em tubos de 16 x 150 mm, os seguintes volumes: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mL. Os tubos foram completados para o volume final de 1,0 mL com água destilada.

A cada tubo foram adicionados 5,0 mL de reagente D, seguido de agitação. Após 10 minutos de reação à temperatura ambiente foram adicionados 0,5 mL de reagente E e agitados vigorosamente. Após 20 minutos, foram realizados a leitura em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 600 nm. Para cada valor de absorbância correspondeu-se a uma concentração de Albumina soro bovina.

IV.5 - PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA D

A purificação da enterotoxina D consistiu basicamente de 2 cromatografias de troca iônica com as resinas Amberlite CG-50 e CM-Sepharose CL-6B e uma de exclusão de gel em Sephadex G-75.

IV.5.1 - TRATAMENTO DA RESINA AMBERLITE CG-50 PARA A 1a CROMATOGRAFIA

A resina Amberlite CG-50 foi tratada previamente a pH12 com NaOH 6N; deixando-se sob agitação com barra magnética por 1 hora. A seguir a resina foi lavada com água destilada, desprezando-as partículas finas, até se atingir a neutralidade. Posteriomente, o pH da resina foi ajustado a pH 2,0 com HCl 2N, deixando-se sob agitação por 1 hora, seguido de lavagem com água destilada até se atingir pH 7,0. Após este tratamento a resina foi lavada sucessivas vezes com tampão fosfato de sódio 0,005M a pH 5,6, até que o mesmo atingisse o equilíbrio.

IV.5.2 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM AMBERLITE CG-50

Nesta etapa, a Resina Amberlite CG-50 foi adicionada ao sobrenadante livre de células previamente diluído a 1:5 em água destilada e ajustado para pH a 5,6 com HCl 6N, mantendo-se em agitação por 2 horas a temperatura ambiente. A resina adsorvida de enterotoxinas e impurezas foi empacotada em coluna de vidro de 4,0 x 25 cm e lavada com um volume com água destilada, correspondente a 2 volumes da coluna (100 mL) a um fluxo de 3 mL/ minuto, visando a remoção de impurezas não adsorvidas a resina.

A eluição foi realizada com 700 mL de tampão fosfato de sódio 0,5M contendo 0,5M de NaCl a pH 6,8, a um fluxo de 3,0 mL/minuto. A fração contendo enterotoxina (aproximadamente 700 mL) foi concentrada em saco de diálise com polietilenoglicol 20.000 a aproximadamente 60 mL e dialisado contra tampão fosfato de sódio 0,005M, pH 5,6 durante 48 horas sob refrigeração com agitação e sucessivas trocas de tampão, com a finalidade de remover sais e outras substâncias solúveis e dialisáveis. Os precipitados formados foram removidos por centrifugação a 13.404 g, sob refrigeração. Uma alíquota de 1,0 mL foi reservado para a determinação de proteína e toxina.

IV.5.3 - TRATAMENTO DA RESINA CM-SEPHAROSE CL-6B PARA 2ª CROMATOGRAFIA

A resina CM-Sepharose CL-6B foi tratada primeiramente a pH 12,0 com NaOH 6N, deixando-se em solução durante 2 horas com agitação esporádica com bastão de vidro. A seguir a resina foi lavada com água destilada até atingir a neutralidade. Posteriormente a resina foi tratada a pH 2,0 com HCl 6N deixando-se em repouso por 2 horas com agitação esporádica e lavada com água destilada até que o valor de pH atingisse pH 7,0. Após este tratamento a resina foi lavada sucessivas vezes com tampão de fosfato 0,005 M pH 5,6 até que a mesma atingisse o equilíbrio.

IV.5.4 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE CL-6B

A resina previamente equilibrada foi empacotada a uma coluna de 1,6 x 40 cm e lavada durante 12 horas com solução tampão fosfato de sódio 0,005M pH 5,6 a um fluxo de 0,45 mL/minuto. A amostra (aproximadamente 60 mL) contendo 60,89 mg de proteína total e 9,12 mg de toxina dialisada e límpida foi aplicada no topo da coluna CM-Sepharose CL-6B com um fluxo constante de 0,32 mL/minuto. A seguir a coluna foi lavada primeiramente com tampão fosfato de sódio 0,005M pH 5,6 para remoção de proteínas não adsorvidas. A eluição da toxina foi realizada com 300 mL de

tampão de fosfato de sódio 0,03M a pH 6,0 e posteriormente com 250 mL de tampão fosfato de sódio 0,045M, pH 6,4. O fluxo da eluição foi controlado com bomba peristáltica a uma velocidade de 0,32 ml/minuto e as amostras monitoradas por uma unidade óptica de luz Ultra Violeta de comprimento de onda 280 nm acoplada a registrador.

As frações foram coletadas, sendo programadas para coletar 5,0 mL/tubo e 3,0 mL/tubo nas frações contendo toxina.

As frações contendo a toxina foram agrupadas em um volume conhecido (29,0 mL) de onde foi tomada uma amostra (1,0 mL) para determinação de proteína total e toxina. O volume foi dializado em tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 6,8 durante 12 horas sob refrigeração com sucessivas trocas do tampão e o precipitado formado após a diálise foi removido por centrifugação a 13.400 xg por 15 minutos sob refrigeração. O sobrenadante límpido foi congelado e liofilizado.

IV.5.5 - TRATAMENTO DA RESINA SEPHADEX G-75

A resina Sephadex G-75 foi tratada com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,8 contendo 0,5M de NaCl, posteriormente desaerada com auxílio de bomba à vácuo e empacotada em coluna de 1,6 x 100 cm cuidadosamente, evitando-se a formação de bolhas de ar e zonas

de separação do gel.

A resina assim empacotada foi equilibrada por 12 horas com solução de tampão fosfato de sódio 0,005M pH 6,8 contendo 0,5M de NaCl a um fluxo de 0,42 mL/minuto. Foi testada a eficiência do empacotamento fazendo-se a filtração de solução de Dextran Blue 2.000.

IV.5.6 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE GEL EM SEPHADEX G-75

A fração liofilizada da 2ª cromatografia foi dissolvida em 2,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,005M, pH 5,6 correspondendo a 16,24 mg de proteína total e 4,21 mg de toxina aplicada no topo da coluna a um fluxo de 0,42 mL/minuto. As frações foram coletadas em coletor de fração com progamação para coletar 5,0 mL por tubo e nas frações contendo proteína foram coletados 3,0 mL/tubo. O controle da absorbância foi realizada em monitor de luz ultra-violeta a um comprimento de onda de 280 nm e os cromatogramas foram registradas automaticamente em registrador de papel. As frações componentes do maior pico (20,0 mL) foram combinados e submetidas a análise de proteína e toxina. As frações reunidas foram dialisadas em solução de tampão fosfato de sódio 0,005M pH 6,7 , congeladas e liofilizadas.

IV.6 - PRODUÇÃO DE ANTISSORO CONTRA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D

IV.6.1 - IMUNIZAÇÃO DE COELHOS

Para obtenção de antissoro específico contra enterotoxina estafilocócica tipo D foi utilizado um grupo de 5 coelhos jovens brancos de raça Nova Zelandia de sexo masculino com peso de 2 a 3 kg.

A enterotoxina estafilocócica tipo D produzida pela linhagem *S. aureus* 1151m e purificada no laboratório da UNICAMP/FEA foi dissolvida em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 com concentração de 100 µg e emulsificado em 1 mL de adjuvante de Freund completo e incompleto através da homogenização entre duas seringas acopladas por uma agulha fêmea-fêmea até se obter-se uma emulsão estável quando gotejada sobre a superfície de água.

A imunização foi realizada através de injeção subcutânea na região interna da coxa posterior do animal, com uma dose de 1 mL da emulsão previamente preparada. Os animais foram pesados imediatamente antes, 24 e 40 horas após a injeção com o intuito de se monitorar a variação de peso. Uma vez que houvesse uma perda superior a 200 g o animal deveria permanecer em repouso até a recuperação do peso para que pudesse receber a próxima dose.

IV.6.2 - ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

As imunizações foram realizadas com duas doses de 50 µg de toxina D cada, totalizando-se 100 µg de enterotoxina/coelho. A primeira dose foi realizada em presença de adjuvante de Freund completo considerando-se o dia zero e a segunda dose de reforço foi efetuado em presença de adjuvante de Freund incompleto no 21º dia após a primeira imunização.

IV.6.3 - ANÁLISE DE ANTISSORO

O teste de monitoramento do antissoro foi realizado em amostras de sangue obtidas pela sangria da veia marginal da orelha do animal. O título do soro presente nas amostras de sangue foi medido periodicamente até que atingisse o valor de 20 pelo método de OSP. Após a obtenção do título desejado foi relizado a sangria total que corresponde a aproximadamente 50 mL de sangue, obtido por punção cardíaca. O sangue coletado foi transferido para frascos previamente lavados com solução salina 0,85%. Após a coagulação, os frascos foram incubados a 37°C por 30 minutos para acelerar a retração do coágulo. O soro assim obtido foi centrifugado a 540 xg por 5 minutos a 4°C.

IV.6.4 - DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO SORO

O título do soro foi determinado pelo método de OSP (IV.2), e é definido como sendo a última diluição do soro que fornece uma linha única de precipitação quando ensaiada contra enterotoxina D, na concentração de 4 µg/mL, pelo método de dupla difusão em gel (OSP) após incubação a 37°C por 24 horas.

IV.6.5 - PURIFICAÇÃO DE ANTISSORO (IgG)

O método frequentemente utilizado para fracionamento de antissoro é a precipitação a frio com sulfato de amônio (48).

O antissoro obtido do sangue dos animais foi fracionado com sulfato de amônio a 35% de saturação. O sulfato de amônio foi adicionado vagarosamente ao soro sob agitação a frio em banho de gelo seguindo-se a uma agitação por duas horas. A solução foi centrifugada a 8.800 xg por 10 minutos e o precipitado formado resuspenso em solução salina 0,85% a um volume igual ao original do soro. Na segunda etapa adicionou-se lentamente sulfato de amônio à solução protéica até 35% de saturação, mantendo-se a amostra sob agitação durante duas horas em banho de gelo. A solução foi imediatamente centrifugada e o sobrenadante removido e guardado para posterior análise. No terceiro fracionamento, o precipitado foi ressupendido e tratado com sulfato de amônio da

mesma forma que o fracionamento anterior.

Após o 3º fracionamento do antissoro, o precipitado foi resuspendido em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2 contendo 0,85% de NaCl e dialisado no mesmo tampão até a completa remoção de $(NH_4)_2SO_4$. Um pequeno volume de sulfato de bário a 10% adicionado a um igual volume de dialisado foi utilizado para verificação da presença de sulfato de amônio. A presença de $(NH_4)_2SO_4$ foi evidenciada pela formação de um precipitado branco, quando a solução dialisada permaneceu translucida, o dialisado foi considerado livre de sal sulfato de amônio. Posteriormente a solução dialisada foi purificada por cromatografia de exclusão em coluna de 1,6 x 100 cm contendo Sephacryl S-200 equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada a uma velocidade de 0,42 mL/minuto e as frações contendo IgG foram combinadas, concentradas e dialisadas em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 9,6. A atividade deste soro foi determinada pelo método de OSP (Optimum Sensitive Plate), e a solução foi distribuída em frascos e mantidos sob congelamento.

IV.6.6 - ANÁLISE DA PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA OUTRAS PROTEÍNAS DE *Staphylococcus aureus*

Os soros obtidos no processo de imunização contra enterotoxina estafilocócica D foram testados pelo método de imunodifusão em dupla dimensão contra o sobrenadante da linhagem de *S. aureus* 1151m que é considerada como padrão para a purificação de enterotoxina D e a *S. aureus* 184 que é uma linhagem produtora de diversas proteínas extracelulares e imunogênicas em forma similar a linhagem *S. aureus* 1151m, exceto com a relação a produção de enterotoxina D.

IV.7 - ELETROFORESE VERTICAL EM GEL SDS (DODECIL SULFATO DE SÓDIO) *

A análise eletroforética da enterotoxina D purificada foi realizada para monitorar a eficiência das etapas de purificação e garantir a presença de uma proteína no final do procedimento de purificação.

IV.7.1 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PROTEICAS

Um volume de amostra contendo 10µg/mL de proteína foi misturada com solução tampão para tratamento da amostra (j*) em quantidades iguais e aquecida em Banho-Maria sob ebulição por 60 segundos. Após o uso, as amostras foram congeladas a -4°C para a próxima análise.

IV.7.2 - PREPARO DA PLACA PARA ELETROFORESE VERTICAL

As placas para a eletroforese foram montadas utilizando-se um espaçador de 1,5 mm de espessura e vedadas com solução de agarose 1% para evitar vazamento do gel.

* Apêndice I

IV.7.3 - PREPARO DO GEL DE SEPARAÇÃO

Em Erlemmeyer de 125 mL foram misturadas vagarosamente 20,0 mL de solução (a*), 15 mL de tampão (b*), 24,1 mL de H_2O destilada, 0,4 mL de solução (d*). A seguir adicionou-se 300µL de solução de persulfato de amônio 10% (e), 20µL de TEMED (tetra etil metil etileno diamino) e misturou-se cuidadosamente, evitando a formação de bolhas.

A solução foi despejada entre as placas previamente preparadas como descrito no ítem IV.7.2 até atingir cerca de 2,0 cm abaixo do topo superior. A seguir a superfície da solução foi coberta cuidadosamente com água destilada. A placa ficou em repouso por aproximadamente 30 minutos, até a completa polimerização do gel (a interface líquida torna-se visível). Após a polimerização, a água destilada foi removida com papel absorvente.

IV.7.4 - PREPARO DO GEL SUPERIOR

Em frasco de 50 mL foram misturadas vagarosamente 2,66 mL de solução (a*), 5,0 mL de tampão (c*), 12,2 mL de água destilada, 0,2 mL de SDS 10% (d*). A seguir foram adicionadas 100µL de solução de persulfato de amônio 10%, 10,0µL de TEMED e misturados cuidadosamente, evitando a formação de bolhas. A placa descrita no ítem IV.7.3 foi completada com gel do topo e o pente foi

inserido evitando-se a formação de bolhas. A placa ficou em repouso por aproximadamente 30 minutos, até a completa polimerização do gel. O pente e o separador inferior foram removidos cuidadosamente tomando-se o cuidado para não se destruir os orifícios superiores e a base do gel. Estes foram lavados com água destilada e enxaguados com cuidado. Posteriormente os orifícios foram preenchidos com tampão de reservatório (f*).

IV.7.5 - CORRIDA DA AMOSTRA

As amostras preparadas como no ítem IV.7.1 foram colocadas em cada orifício em quantidades de 10µL, com o auxílio de uma microseringa de 50µL. A cuba para eletroforese vertical contendo a placa foi conectada a Fonte PS 500 XT (conecção auperior - anodo e inferior - cátodo). A corrida eletroforética foi iniciada com uma corrente de 80V e aumentada gradualmente até atingir 100V. O tempo de corrida foi de aproximadamente 4 horas.

IV.7.6 - REVELAÇÃO DO GEL

O gel foi cuidadosamente removido das placas e colocado em solução corante (g*) por aproximadamente 8 horas, agitando-se esporadicamente. Após esse tempo o gel foi removido e transferido para a solução descorante I (h*) por 1 hora e depois para a solução descorante II (i*) até o completo descoramento e a seguir fixado em papel celofane.

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 - PURIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCIA TIPO D

O sobrenadante da cultura apresentou uma concentração de 3,07 mg/mL de proteína e 3,64 µg/mL de enterotoxina D.

O volume de sobrenadante livre de células utilizados para iniciar o processo de purificação foi de 3.500 mL, tendo uma concentração de 10.763,00 mg de proteína total e 12,74 mg de enterotoxina total (talela 1).

No processo de adsorção de enterotoxina à resina Amberlite CG-50 houve uma recuperação de 9,12 mg de enterotoxina, que corresponde a uma recuperação de 71,63% nesta etapa de purificação.

A fração combinada da primeira cromatografia contendo 60,89 mg de proteína e 9,12 mg de enterotoxina foi adsorvida em coluna de CM-Sepharose CL-6B. A toxina foi eluída a temperatura ambiente com tampão fosfato de sódio 0,005M pH 5,6, obtendo-se uma

recuperação de 4,21 mg de enterotoxina D, resultando num rendimento de 46,20% nesta etapa de purificação. A fig. 3 mostra o comportamento da eluição da enterotoxina D em cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose CL-6B. A fração contendo enterotoxina apresentou uma contaminação por substância amarela escuro que não pode ser removida neste estágio e nem na subsequente filtração em gel como citado por Chang e Bergdoll (29).

A fig 4 mostra o comportamento da eluição no processo de filtração em gel em Sephadex G-75 que apresentou um bom rendimento de enterotoxina (76,67%). Por outro lado, quando efetuada a separação com Sephacryl S-200 como citada no trabalho de Lei et al.(69), foi impossível a recuperação significativa de enterotoxina D. Com base nos resultados obtidos pudemos verificar que a resina Sephacryl S-200 interferiu com a eluição da enterotoxina D, impossibilitando a sua recuperação que só foi conseguido com a utilização da resina Sephadex G-75. A concentração de toxina no extrato bruto (sobrenadante da cultura) e no final do processo de purificação foi determinado pelo método de Oudin. Desta forma o rendimento global obtido no processo de purificação foi de 25,35%. O resultado de cada passo de purificação é mostrado na tabela 1. Os resultados obtidos foram superiores aos valores obtidos por Chang e Bergdoll (29) e ainda apresentando como vantagens o fato de utilizar apenas três etapas de purificação ao contrário do método convencional que utiliza 5

etapas de purificação, o que torna o trabalho longo, exaustivo e com rendimento pobre .

A baixa recuperação está diretamente relacionada a quantidade de enterotoxina D presente no sobrenadante de cultura. O trabalho de purificação foi desenvolvido com tentativas experimentais baseando-se nos primeiros trabalhos publicados por Lei et al (69), Chang e Bergdoll (29) e o procedimento recomendado para a purificação de enterotoxina D fornecido por Dr. Bergdoll (comunicação pessoal).

A enterotoxina D purificada, quando ensaiada pelo método de OSP (Optimum Sensitive Plate) com antissoro produzido contra extrato bruto de enterotoxina D bruto apresentou somente uma linha de precipitaçao. O
que demonstra um alto grau de pureza. Esta caracterísitica foi confirmada pela eletroforese vertical em gel SDS, onde se observou apenas uma banda, enquanto que a toxina padrão parcialmente purificada (fornecido pelo Prof. Dr. Bergdoll - FRI) apresentou multiplas bandas. Este padrão corresponde ao eluído após adsorção em Amberlite (Bergdoll - comunicação pessoal) (fig.6). O sobrenadante da linhagem 184 quando ensaiado contra o soro obtido pella inoculação da toxina D purificada não apresentou linhas de precipitação, o que indica que o animal foi imunizado com enterotoxina estafilocócica D pura.

V.2 -PRODUÇÃO DE ANTISSORO CONTRA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO D

A imunização de coelhos com enterotoxina estafilocócica D para a obtenção do antissoro é um processo dispendioso e demorado, em virtude da alta toxicidade da toxina e da relativamente baixa antigenicidade da proteína (99). É em geral necessário um número elevado de animais e um tempo longo nos esquemas de imunização dos coelhos para se obterem resultados significativos.

Uma das principais dificuldades para a imunização dos animais é a obtenção de quantidades apropriadas de enterotoxina D purificada para o procedimento, uma vez que a produção desta toxina é baixa mesmo em linhagens selecionadas como boas produtoras e pelo baixo rendimento nos processos de purificação, também relacionados a baixa concentração inicial de toxina (99, 76). O que não se verifica para as demais enterotoxinas estafilocócicas.

De acordo com a literatura (99), o título máximo de anticorpos para a enterotoxina D ocorre na segunda semana após a última injeção. Com base nesses dados da literatura o nível de anticorpos nos doros dos animais imunizados com enterotoxina estafilocócica D purificada foram analisados somente após a

segunda semana de inoculação.

Para se obter um título satisfatório de anticorpos contra enterotoxina estafilocócica D foi necessário inocular um total de 100 µg de toxina por coelho, distribuídos em 2 injeções de 50 µg de toxina cada uma. Os títulos dos soros obtidos foram de 32, 16 e 20 para animais 1, 3 e 4, respectivamente, sendo que o título foi determinado pelo método de dupla difusão em gel contra 4 µg/mL de enterotoxina D (tabela 2). A perda dos animais durante o experimento é imprevisível e irreparável, desta forma é necessário trabalhar com um grande número de animais (tabela 3).

O método apresentado oferece vantagens em relação método clássico publicado por Robbins e Bergdoll (99) e Morissete et al. (76) por requerer uma pequena quantidade de enterotoxina e um número reduzido de injeções. A outra vantagem é a diminuição do custo para a obtenção do soro específico, uma vez que a purificação da enterotoxina D é difícil e cara devido a baixa produção desta toxina por linhagens de ***S. aureus***.

A substituição do método de Oudim utilizado por Robbins e Bergdoll (99) pelo método de dupla difusão em gel (OSP - Optimum Sensitive Plate) para a determinação do título do soro, representa uma grande economia de reagentes e custo para o laboratório, considerando-se que no primeiro método é requerida uma quantidade de aproximadamente 2 mL de soro teste e 20 µg de enterotoxina D

para cada teste e no segundo método apenas aproximadamente 0,6 mL de soro teste e 0,2 mL de enterotoxina D na concentração de 4µg/mL. A obtenção dos resultados é rápida no método de OSP (24 horas), enquanto que no método de Oudin são necessárias 7 dias de (140).

VI - CONCLUSÕES

- A utilização do frasco Fernbach de 2,8 litro favorece a produção de enterotoxina (3,64 µg/mL) por apresentarem maior superfície de aeração e a utilização de maior velocidade de rotação quando comparados com os procedimentos descritos em literatura (2µg/mL) (70).

- O meio de cultura contendo 3% de triptona e 1% de extrato de levedura utilizado para purificação de enterotoxina D pode substituir perfeitamente o meio NZ-Amine NAK, uma vez que o ultimo não é mais comercializado.

- Os resultados obtidos na purificação de enterotoxina D (25,35%) foram superiores aos valores citados na literatura mesmo utilizando-se um volume de 3,6 litros em comparação com os volumes citados por outros autores.

- Quanto ao processo de purificação de enterotoxina D, a utilização da resina Sephacryl S-200 para o processo de filtração em gel não é recomendada devido a grande interferência e perda da atividade da toxina, impossibilitando sua recuperação.

- O presente trabalho simplifica o processo de purificação de Chang e Bergdoll (29), tornado-o um método mais rápido e eficiente.

- A enterotoxina D purificada neste trabalho apresenta alto grau de pureza, quando analisada por eletrofore vertical em gel SDS.

- O esquema de imunização proposto neste trabalho, de apenas duas injeções minimiza a tensão dos animais favorecendo a maior produção de anticorpos.

- A quantidade de enterotoxina D utilizada (100 µg/animal) na imunização, apresenta vantagens em relação aos métodos propostos na literatura (acima de 230 µg/animal) tanto pela diminuição do custo e tempo do procedimento, como pela obtenção de títulos de antissoros adequados para os métodos sorológicos de dosagem.

- O tempo necessário de 35 dias para obtenção de soros de títulos compreendidos entre 16 e 32 é superior ao mencionado na literatura que requer 60 dias para a obtenção de soros com um título de 10.

- O grau de especificidade do soro obtido foi elevado, pois não apresentou nenhuma reação quando ensaiado contra o sobrenadante da linhagem *S. aureus* 184.

- Com os resultados obtidos na imunização de coelhos podemos concluir que é necessário trabalhar com um grande número de animais, uma vez que a perda destes durante o experimento é imprevisível e irreparável.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - ABRANSON, C. Staphylococcal enzymes. In COHEN, J.O. Staphylococci. New York, John Wiley & Sons, 1972. p.187-248.

2 - ADESIYUN, A.A.; LENZ, W. & SCHAAL, K.P. Phage susceptibility and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated fron Nigerian foods. J. Food Protection, 55(11): 871-873, 1992

3 - ADESIYUN, A.A. & TATINI, S.R. Suitability of cynomologous (*Macaca fascicularis*) for staphylococcal enterotoxin bioassay. J. Food Safety, 3: 193-198, 1981.

4 - ADESIYUN, A.A.; TATINI, S.R. & HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by ***Staphylococcus hycus***. Veterin. Microbiol., 9: 487-495, 1984.

5 - AVENA, R.M. & BERGDOLL, M.S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C from ***Staphylococcus aureus*** strain 361. Biochemistry, 6: 1474-1480, 1967.

6 - BAER, E.F.; GRAY, J.H. & ORTH, D.S. Methods for the isolation and enumeration of ***Staphylococcus aureus***. In: SPECK, M.L. Compendium of Methods for the Examination of Foods. Washington, American Public Health Association, 1976. p.374-386.

7 - BAIRD-PARKER, A.C. Methods for identifyng staphylococci and micrococci. In: SKINNER, F.A. & LOVELOCK, D.W.(ed.) Identification methods for microbiologistis, 2.ed. Academic Press, Inc., London, 1979. p.201-210.

8 - BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci: an introduction. J. Appl. Bacteriol. Symposium Suplement, **19**: 1S-8S, 1990.

9 - BARBER, M.A. Milk poisoning due to a type of ***Staphylococcus albus*** occuring in the uddler of a healthy cow. Phillippine J. Science Section B (Tropical Medicine), **9**: 515-519, 1914.

10 - BARBER, L.E.; DEIBEL, R.H. Effect of pH and oxygen tension of staphylococcal growth and entrotoxin formation in fermented sausage. Appl. Micobiol., **24**: 891-898, 1972.

11 - BERDAL, B.P.; OLSVIK,O. & OMLAND, T. A sandwich ELISA method for detection of ***Staphylococcus aureus*** enterotoxins. Acta Pathologica et Microbiologica Sacandinavica, **89B**: 411-415, 1981.

12 - BERGDOLL, M.S. Analytical methods for ***Staphylococcus aureus***. Intern. J. of Food Microbiol., **10**: 91-100, 1990.

13 - BERGDOLL,M.S. Chemistry and detection of staphylococcal enterotoxin. Proc. Res. Conf. Res. Advisory Council Am. Meat Inst. Found. Univ. Chicago, **14**: 47-53, 1962.

14 - BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: Easman, C.F.S. & Adlan, C. Staphylococci and Staphylococcal Infections. Academic Press, Inc (London), Ltd., London, 1983. Vol.2. p.559-598.

15 - BERGDOLL, M.S. The enterotoxins. In: Thomas,C.M.; Kadin, S. & Ajl, S.J. Microbial Toxins. New York, Academic Press, 1970. Vol.III. p. 265-327.

16 - BERGDOLL, M.S. The enterotoxins. In: Cohen, J.O. The staphylococci. New York, Wiley Interscience Publishers, 1972. p.187-331.

17 - BERGDOLL, M.S. Staphylococcal intoxications. In: Riemann, H. & Bryan, F.L. Food-borne infections and intoxications. 2.ed., New York, Academic Press, 1979. p.443-494.

18 - BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R. & AVENA, M.R. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. J. Bacteriol., **90**: 1481-1485, 1965.

19 - BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N. & WEISS, K.F. Identification of enterotoxin E. Infect. Immun., **4**: 593-595, 1971.

20 - BERGODLL, M.S.; SUGIYAMA, H. & DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin I Purification. Archiv. Biochem. Biophys., **85**: 62-69, 1959.

21 - BERGDOLL, M.S.; SUGIYAMA, H. & DACK, G.M. The recovery of staphylococcal enterotoxin from bacterial culture supernatants by ion exchange. J. of Biochem. and Microbiol. Technol. Engineering, **III**(1): 41-50, 1961.

22 - BORJA, C.R. & BERGDOLL, M.S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by ***Staphylococcus aureus*** strain 137. Biochemistry, **6**: 1467-1473, 1967.

23 - BORJA, C.R.; FANNING, E.; HUANG,E. & BERGDOLL, M.S. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. J. Biol. Chem., **247**: 2456-2463, 1972.

24 - BREHM, R.D.; HOWARD, S.T.; HAMBLETON, P. & MELLING, J. Large-scale purification of staphylococcal enterotoxin A, B, and C_2 by dye ligand affinity chromatography. Appl. Environ. Microbiol., **56**(4): 1067-1072, 1990.

25 - CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Production of antiserum for staphylococcal enterotoxin. Appl. Microbiol., **12**: 363-367, 1964.

26 - CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Detection of staphylococcal enterotoxins in food. Appl. Microbiol., **13**: 181-189, 1965.

27 - CASMAN, E.P.; BENNETT. R.W.; DORSEY, A.E. & ISSA, J.A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J. Bacteriol., **94**: 1875-1882, 1967.

28 - CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S. & ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxins. J. Bacteriol., **85**: 715-716, 1963.

29 - CHANG, P.C. & BERGDOLL, M.S. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. Biochemistry, **18**: 1937-1942, 1979.

30 - CHU, S.F.; THADHANI, K.; SCHANTZ, E.J. & BERGDOLL, M.S. Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry, **5**: 3281-3289, 1966.

31 - COLLINS, W.S., JOHNSON, A.D. METZGER, J.F. & BENNETT, R.W. Rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., **25**: 774-777, 1973.

32 - COLLINS, W.S.; METZGER, J.F. & JOHNSON, A.D. A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylocccal B enterotoxin. J. of Immunology, **108**: 852-856, 1972.

33 - DACK, G.M. Food Poisoning. 2.ed. Chicago: University Press, 1949.

34 - DACK, G.M.; CARY, W.E.; WOOLPERT, O. & WIGGINS, H.J. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow haemolitic staphylococcus. J. Prevent. Medicine, **4**: 167-175, 1930.

35 - DANIELSON, M.L. & HELLBERG, B. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. Acta Vet. Scand., **18**: 266-273, 1977.

36 - DAVISON, E.; DACK, G.M. & CARY, W.E. Attempts to Assay the Enterotoxic substance produced by staphylococci by parenteral injection of monkeys and kittens. J. Infect. Disease, **62**: 219-223, 1938.

37 - DELAZARI, I. & LEITÃO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em macarrão. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas **7**: 485-497, 1976.

38 - DUCAN, J.L. & CHO, G.J. Regulation of staphylococcal alpha toxin. II. Glucose repression of toxin formation. Infect. Immun., **6**: 689-694, 1972.

39 - EDWIN, C.; TATINI, S.R. & MAHESWARAN, S.K. Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C_1, D, and E. Appl. Environ. Microbiol., 52(6): 1253-1257, 1986.

40 - ELSTON, H.R. & FITCH, D.M. Potential pathogenicity of staphylococci. Am. J. Clin. Pathol., 42: 346-348, 1964.

41 - ENDE, I.A.; TERPLAN, G.; KICKHOFEN, & HAMMER, D.K. A new method for purification of staphylococcal enterotoxin B and C. Appl. Environ. Microbiol., 46: 1323-1330, 1983.

42 - FEY, H. Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln und denen Nachweis. Chem. Rundschau, 31: 6-9, 1978.

43 - FEY, H.; STIFFLER-ROSENBERG, C.; WARTENWEILER-BURKHARD, G.; MULLER, C. & RUEGG, O. Der na hweiss von staphylokokken-enterotoxinen (SET). Schweizer Archiv fur Tierheilknde, 124: 297-306, 1982.

44 - FREED, R.C.; EVENSON, M.L.; REISER, R.F. & BERGDOLL, M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enteroroxin in foods. Appl. Environ. Microbiol., **44**: 1349-1355, 1982.

45 - FUKUDA, S.; TOKUNO, H.; GAWA,H.O. Enterotoxigenicity Staphylococcus intermedius strains isolated from dogs. Zbl. Bakteriol. Hyg. A, **258**: 360-367, 1984.

46 - GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. Int. J. Food Microbiol., **9**: 327-360, 1989.

47 - GENIGEORGIS, C.A. & SADLER, W.W. Immunofluorescent detection of staphylococcal enterotoxin B. I. Detection in culture media. J. Food Sci., **34**: 62-68, 1966.

48 - HERBERT, G.A.; PELHAM, P.L. & PITTMAN, B. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisers. Appl. Microbiol., **25**(1): 26-36, 1973.

49 - HUANG, I.Y. & BERGDOLL, M.S. The primary struture of staphylococcal enterotoxin B. III. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethlated enterotoxin B, and the complete amino acid sequence. J. Biol. Chem., **245**: 3518-3525, 1970.

50 - HUANG, I.Y.; SCHANTZ, E.J. & BERGDOLL, M.S. The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **28**: 73-75, 1976.

51 - IANDOLO, J.J. & DYER, D.W. The staphylococcal enterotoxins - a genetic overview. J. Food Safety, **3**: 249-264, 1981.

52 - IANDOLO, J.J. & SHAFER, W.M. Regulation of staphylococcal enterotoxin B. Infect. and Immun., **16**: 610-616, 1977.

53 - IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHINGAKI, M. & BERGDOLL, M.S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. J. Clin. Microbiol., **23**: 509-512, 1986.

54 - JAMLANG, E.M.; BARLETT, M.L. & SNYDER, H.E. Effect of pH, protein concentration and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., **23**: 1034-1040, 1971.

55 - JAULHAC, B.; BES, M.; BORNSTEIN, N.; PIÉMONT, Y.; BRUNT, Y. & FLEURETTE, J. Synthetic DNA probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E and for TSST-1 in staphylococcal strains. J. Appl. Microbiol., **72**: 386-392, 1992.

56 - JOHANSSON, H.O.J.; PETTERSSON, N.T. & BERGDOLL, M.S. Development of a process for large scale purification of enterotoxin B from ***S. aureus*** cell culture supernatants. In: Neijessel, O.M.; Van Der Meer, R.R. & Luyben, K.C.A.M. Proceeding of the 4th European Congress on Biotechnology. Amsterdam, Elsevier Science, 1987. p.488-491.

57 - JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A. & KAUFFMAN, P.E. Staphylococcal enterotoxin A and B: solid phase radioimmunoassay in food. Appl. Microbiol., **26**: 309-313, 1973.

58 - JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMAN, P.E. & PEELER, J.T. Staphylococcal enterotoxin B: Solid Phase Radioimmunoassay. Appl. Microbiol., 22(5): 837-841, 1971.

59 - JOHNSON, H.M.; HALL,H.E. & SIMON, M. Enterotoxin B: serological assay by passive hemagglutination. Appl. Microbiol., 16: 1019-1023, 1967.

60 - JONES, C.I. & KHAN, S.A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from ***Stahylococcus aureus***. J. Bacteriol., 166: 29-33, 1986.

61 - JORDAN, E. O.; DACK, G.M. & WOOLPERT, O. The effect of heat, storage and chlorination on the toxicity of staphylococcus filtrates. J. Prevent. Med., 5: 383-386, 1931.

62 - JOZEFCZYK, Z. Specific human antibodies to enterotoxin A, B, and C_1 of ***Staphylococcus***: their increased synthesis in staphylococcal infections. J. Inf. Diseases, 130: 1-7, 1974

63 - KAUFFMAN, P.E. Enzymeimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. J. of the Assoc. of Official Analytical Chemistry, 63: 1138-1143, 1980.

64 - KELLER, G.M.; HANSON, R.S. & BERGDOLL, M.S. Effect of minerals on staphylococcal enterotoxin B production. Infect. and Immun., **20**: 158-160, 1978.

65 - LACHICA, V.R. Accelerated procedure for the numeration and identification of food-borne *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol., **39**: 17-19, 1980.

66 - LEE, C.L. & LIN, C.C. Detection of staphylococcal enterotoxin by latex agglutination inhibition test. Chin. J. Microbiol. Immunol., **17**: 7-80, 1984.

67 - LEE, A.C.; ROBBINS, R.N. & BERGDOLL, M.S. Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins A and E by affinity chromatography. Infect. Immun., **21**: 387-391, 1978.

68 - LEE, A.C.M.; ROBBINS, R.N.; REISER, R.F. &BERGDOLL, M.S. Isolation of specific and common antibodies, to Staphylococcal enterotoxins B, C and C_1. Infect. and Immunity, **27**: 431-434, 1980.

69 - LEI, Z.; REISER, R.F. & BERGDOLL, M.S. Chromatofocusing in the purification of staphylococcal enterotoxin D. J. Clin. Microbiol., **26**(6): 1236-1237, 1988.

70 - LOPES, H.R.; NOLETO, A.L.S. & BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxins A, D, and E by sac culture. J. Food Protection, 54(8): 650-652, 1991.

71 - LOWRY, O.W., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALLL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.

72 - MARKUS, Z.H. & SILVERMAN, G.J. Factors affecting the secretion od staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., 20: 492-496, 1970.

73 - MELCONIAN, A.K.; BRUN, Y. & FLEURETTE, J. Enterotoxin production, phage typing and serotyping of ***Staphylococcus aureus*** strains isolated from clinical materials and food. J. of Hygiene Cambridge, 91: 235-242, 1983.

74 - METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D. & COLLINS, W.S. Fractionation and purification of ***Staphylococcus aureus*** enterotoxin B by eletrofocusing. Biochim. Biophys. Acta, 257: 183-186, 1972.

75 - METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D.; COLLINS II, W.S. & McGANN, V. ***Staphylococcus aureus*** enterotoxin B release (excretion) under controlled conditions of fermentation. Appl. Microbiol., **25**: 770-773, 1973.

76 - MORISSETE, C.; GOULET, J. & LAMOUREUX, G. Production of avid rabbit antibodies against staphylococcal enterotoxins A and B. J. Food Protection, **53**(9): 782-785, 1990.

77 - MORITA,T.N.; PATTERSON, J.E. & WOODBURN, M.J. Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal A, B, and C. Appl. Environ. Microbiol., **38**: 39-42, 1979.

78 - MORSE, S.A. & BALDWIN, J.N. Regulation of staphylococcal enterotoxin B: effect of thiamine starvation. Appl. Microbiol., **22**: 242-249, 1971.

79 - MORSE, S.A. & MAH, R.A. Microtiter haemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B. J. Appl. Microbiol., **15**: 58-61, 1967.

80 - MORSE, S.A. & MAH, R.A. Regulation of staphylococcal enterotoxin B: effect of anaerobic shock. Appl. Microbiol., **25**: 553-557, 1973.

81 - MORSE, S.A.; MAH, R.A. & DOUBROGOSZ, W.J. Regulation of staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol., 98: 4-9, 1969.

82 - NUNHEIMER, T.D. & FABIAN , F.W. Influence of organic acids, sugars and sodiun chloride upon strains of food pooisoning staphylococci. Amer. J. Publ. Health, 30: 1040-1049, 1940.

83 - OGSTON, A. Report upon microorganisms in surgical diseases. British Medical Journal, 1: 369-375, 1882.

84 - OHNE, M. Regulation of dicarboxilic acid part of the citric acid cycle in ***Bacillus subtilis***. J. Bacteriol., 122: 224-234, 1975.

85 - ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNÁNDEZ, J.; DOMéNECH, A.; SUÁREZ, G. & GÓMEZ-LÚCIA, E. Applicability of an immunoblot techinique combined with a semiautomated electrophorese system for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. Appl. Environ. Microbiol., 58(12): 4083-4085, 1992.

86 - OUCHTERLONY, O. Antigen antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scandinavia, 25: 507-515, 1949.

87 - OUDIN, J. Specific precipitation in gels. Methods Med. Res., 5: 335-378, 1952.

88 - PAYNE, D.N. & WOOD, J.M. The incidence of enterotoxin production in strains of ***Staphylococcus aureus*** isolated from foods. J. Appl. Bacteriol., 37: 319-325, 1974.

89 - PARK, C.E. & SZABO, R. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C, and D in foods. Can. J. Microbiol., 32: 723-727, 1986.

90 - PEREIRA, J.L. & SALZBERG, S.P. Regulation of staphylococcal enterotoxins A and B produced by strains S-6. J. Food Protection, 45: 1306-1309, 1982.

91 - PEREIRA, J.L.; SALZBERG, S.P. & BERGDOLL, M.S. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on productions of staphylococcal enterotoxins A and B. J. Food Protect., 45: 1306-1309, 1982.

92 - PEREIRA, J.L.; SALZBERG, S.P. & BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing staphylococci. Int. J. of Food Microbiol., **14**: 19-26, 1991.

93 - PRICE, V.L. & GALLANT, J.A. The glucose effect in ***Bacillus subtilis***. Europ. J. Biochem., **134**: 105-107, 1983.

94 - RAYMAN, M.K.; PARK, C.E.; PHILPOTT, J. & TODD, E.C.D. Reassessment of the coagulase and thermonuclease tests as means of identifyng *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., **29**: 451-454, 1975.

95 - READ, R.B. & BRADSHAW, J.G. Irradiation of staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., **15**: 603-605, 1967.

96 - REALI, D. Enterotoxin A and B production in strains of ***Staphylococcus aureus*** isolated from human beings and foods. J. Hyg. Cam., **88**: 103-106, 1982.

97 - REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A.L.; KHOE, G.P. & BERGDOLL, M.S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. Infect. Immun., **45**: 625-630, 1984.

98 - REYNOLDS, D.; TRANTER, H.S.; SAGE,R. & HAMBLETON, P. Novel method for purification of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Environ. Microbiol., 54(7): 1761-1765, 1988.

99 - ROBBINS, R.N. & BERGDOLL. M.S. Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxin. J. Food Protect., 47: 172-176, 1984.

100 - ROBBINS, R.N.; GOULD, S. & BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of ***Staphylococcus aureus*** strains. Appl. Microbiol., 28: 946-950, 1974.

101 - ROBERN, H.; STAVIC, S. & DICKIE, N. Fractionation of staphylococcal enterotoxin A by isoelectric focusing. Experientia, 30: 1087-1089, 1974.

102 - ROBERN, H.; STAVIC, S. & DICKIE, N. The application of QAE-Sephadex for the purification or two staphylococcal enterotoxins. II. Purification of enterotoxin A. Biochim. Biophys. Acta, 393: 159-164, 1975.

103 - ROSENBACH, F.J. Mikroorganismen bei den Wundinfections-krankheiten des Menschen, Wiesbaden: Bergmann, J.F., 1884.

104 - SALOMON, L.L. & TEW, R.W. Assay of staphylococcal enterotoxin B by latex agglutination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **129**: 539-542, 1968.

105 - SAUVAGE, J.P. Le monde actérien O.R.L. En: L'Antibiotherapie en ORL. Guide des lésions bactériennes rencontrées en Pathologie Cervico-Faciale. Beecham-Sevigne, 1979.

106 - SAUNDERS, G.L. & BARTLETT, M.L. Double-antibody solid - phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Environ. Microbiol., **34**: 518-522, 1977.

107 - SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.C.; WAGMAN, L. SPERO, D.A. & BERGDOLL, M.S. Purification of staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, **4**: 1011-1016, 1965.

108 - SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.C.; WOODBURN, M.J.; LYNCH, J.M.; JACOBY, H.M.; SILVERMAN, S.J.; GORMAN, J.C. & SPERO, L. Purificatio and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry, **11**: 360-366, 1972.

109 - SCHEUSNER, D.L. & HARMON, L.G. Growth and enterotoxin production by various strains of ***Staphylococcus aureus*** in selected foods. J. Food Science, **38**: 474-476, 1973.

110 - SCHLEIFER, K.H. & KROPPENSTEDT, R.M. Chemical and molecular classification of staphylococci. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement, **19**: 9S-24S, 1990.

111 - SCHMIDT, J.J. & SPERO, L. The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C_1. J. Biol. Chem., **258**: 6300-6306, 1983.

112 - SCHWABE, M.; NOTERMANS, S.; BOOT, R. TATINI, S.R. & KRAMER, J. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. Int. J. Food Microbiol., **10**: 33-42, 1990.

113 - SCOTT, W.J. Water relations of ***Staphylococcus aureus*** at 30°C. Austr. J. Biological Science, **6**: 544-563, 1953.

114 - SHINAGAWA, K.; OMOE, K. & MATSUSAKA, N. Immunological studies on staphylococcal enterotoxin D: production of murine monoclonal antibodies and immunopurification. Can. J. Microbiol., **37**: 586-589, 1991.

115 - SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R. & HOWARD, M. Rapid, Sensitive Assay for Staphylococcal Enterotoxin and a Comparison of Serological methods. Appl. Microbiol., **16**(7): 1019-1023, 1968.

116 - SMEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLF, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol n° 2, 1 st ed. Willlian & Wilkins. Baltimore, 1986. p.999-1035

117 - SMITH, J.L. & BENCIVENGO, M.M. A review of methods for detection of staphylococcal enterotoxins and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay applied to foods. J. of Food Safety, **7**: 83-100, 1985.

118 - SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L. & PALUMBO, S.A. Effect of food enviroment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. J. of Food Protect., **46**(6): 545-555, 1983.

119 - SOO, H.M.; TATINI, S.R. & BENNETT, R.W. Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins A and D. Abstr. Annu. Meeting Am. Soc. Microbiol., p.1, 1973.

120 - SPERO, L.; STEFANYE, D.; BRECHER, P.I.; JACOBY, H.M.; DALIDOWICZ, J.E. & SCHANTZ, E.J. Amino Acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, **4**: 1024-1030, 1965.

121 - SPERO, L.; GRIFFIN, B.Y.; MIDDLEBROOK, J.L. & METZGER, J.F. Effect of single and double peptide bond scission by trypsin on the struture and activity of staphylococcal enterotoxin C. J. Biol. Chem., **251**: 5580-5588, 1976.

122 - SPERO, L. & MORLOCK, B.A. Biological activities of the peptides of staphylococcal enterotoxin C formed by limited tryptic hydrolysis. J. Biol. Chem., **253**: 8787- 8791, 1978.

123 - SPERO, L. & MORLOCK, B.A. Cross-reactions between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxins B and C_1. J. Immunol., **122**(4): 1285-1289, 1979.

124 - SPERO, L.; WARREN, J.R. & METZGER, J.F. Effect of single peptide bond scission by trypsin on the struture and activity of staphylococcal enterotoxin B. J. Biological Chemistry, **248**: 7289-7294, 1973.

125 - STIFFLER-ROSEMBERG, G. & FEY, H. Simple Assay for Staphylococcal Enterotoxins A, B, e C: Modification of Enzyme Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol., **8**(5): 473-479, 1978.

126 - STRICKLER, M.P.; NEILL, R.J.; STONE, M.J.; HUNT, R.E.; BRINKLEY, W. & GEMSKI, P. Rapid purification of staphylococcal enterotoxin B by High-Pressure liquid Chromatograph. J. Clin. Microbiol., **27**(5): 1031-1035, 1989.

127 - SURGALA, M.J.; BERGDOLL, M.S. & DACK, G.M. Some observation on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. J. Laboratory and Clinical Medicine, **41**: 782-785, 1953.

128 - SURGALLA, M.J.; KADAVY, J.L.; BERGDOLL, M.S. & DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin; production methods. J. Infect. Dis., **89**: 180-184, 1951.

129 - TATINI, S.R. Influence of food environments on growth of ***Staphylococcus aureus*** and production of various enterotoxins. J. Milk Food Technol., **36**: 559-563, 1973.

130 - TATINI, S.R.; JEZESKI, J.J.; OLSON, J.C. & CASMAN, E.J. Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. J. Dairy Sci., **54**: 312-320, 1971.

131 - THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Recomended methods for microbiological examination. In: Microorganisms in food, 114-123. University of Toronto Press, 1968.

132 - THOMPSON, N.E.; RAZDAN, M.; KUNTSMANN, G.; ASCHENBACH, J.M.; EVENSON, M.L. & BERGDOLL, M.S. Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassay: Comparison of monoclonal and polyclonal systems. Appl. Envirom. Microbiol., **51**: 885-890, 1986.

133 - TRANTER, H.S. & BREHM R.D. Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. J. Appl. Bacteriol. Suppl., **19**: 109S-122S, 1990.

134 - TROLLER, J.A. Effect of water activity on enterotoxin B production and growth of ***Staphylococcus aureus***. Appl. Microbiol., **21**: 435-439, 1971.

135 - TROLLER, J.A. Effect of water activity and pH on staphylococcal enterotoxin B production. Acta Alimentar, **2**: 351-360, 1973.

136 - VANDENBOSCH, L.L.; FUNG, D.Y.C. & WIDOMSKI, M. Optimum temperature for enterotoxin production by ***Staphylococcus aureus*** S-6 and 137 in liquid medium. Appl. Microbiol., **25**: 498-500,1973.

137 - VARADARAJ, M.C. & RANGANATHAN, B. Isolation and characteristics of Staphylococci from foods: a Review. J. Food Science Techon., **22**: 378-386, 1985.

138 - WADSWORTH, C.A. Slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel. Interm. Arch. Allergy Appl. Immunol., **10**: 355-360, 1957.

139 - WEIRETHER,F.J.; LEWIS, E.E.; ROSENWALD, A.J. & LINCOLN, R.E. Rapid quantitative serological assays of staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., **14**(2): 284-291, 1966.

140 - WEISS, K.F. & ROBBINS, R.N. Relationship between staphylococcal antiserum titer and zone development on immune serum plates. Appl. Microbiol., **19**(6): 911-914, 1970.

141 - WIENEKE, A.A. Enterotoxin production by strains of ***Staphylococcus aureus*** isolated from foods and human beings. J. Hyg. Camb., **73**: 255-262, 1974.

142 - WILLIANS, R.R.; WEHR, C.T.; ROGERS, T.J. & BENNETT, R.W. High perfomance liquid chromatography of staphylococcal enterotoxin B. J. Chromatography, **266**: 179-186, 1983.

Tabela 1 - Quadro geral das estapas de purificação

Etapas	volume (mL)	Proteína Total (mg)	Enterotoxina D total (mg)	Rendimento enterotoxina (%)
A	3500	10.763,00	12,74	100,0
B	700	60,89	9,12	71,63
C	29	16,24	4,21	46,20
D	20	6,54	3,23	76,67
E				25,35

A - Sobrenadante de cultura

B - Valores de frações combinadas da cromatografia de troca iônica em Amberlite CG-50

C - Valores de frações combinadas da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose CL-6B

D - Valores de frações combinadas da cromatografia de exclusão de gel em Sephadex G-75

E - Rendimento global

Tabela 2 - Esquema de imunização

IMUNIZAÇÃO	DIAS	
	1º	21º
TOXINA (µg)	50	50

Tabela 3 - Peso dos animais (Kg) durante a imunização

Dias	Animal				
	1	2	3	4	5
0[a]	2,650	2,500	2,150	2,100	2,550
4	2,370	2,050	2,450	2,250	2,150
7	2,250	-	2,652	2,400	-
12	2,320	-	2,720	2,550	-
18	2,479	-	2,810	2,620	-
21[b]	2,670	-	2,970	2,850	-
27	2,550	-	3,030	2,900	-
31	2,640	-	3,130	2,910	-
35[c]	2,700	-	3,190	3,060	-

a - 1ª dose de injeção

b - 2ª dose de injeção

c - sangria por punção cardíaca

(-) - morte do animal

Tabela 4 - Título dos soros após 14º dia da última injeção

Animal	Título
1	32
2	-
3	16
4	20
5	-

(-) - morte do animal

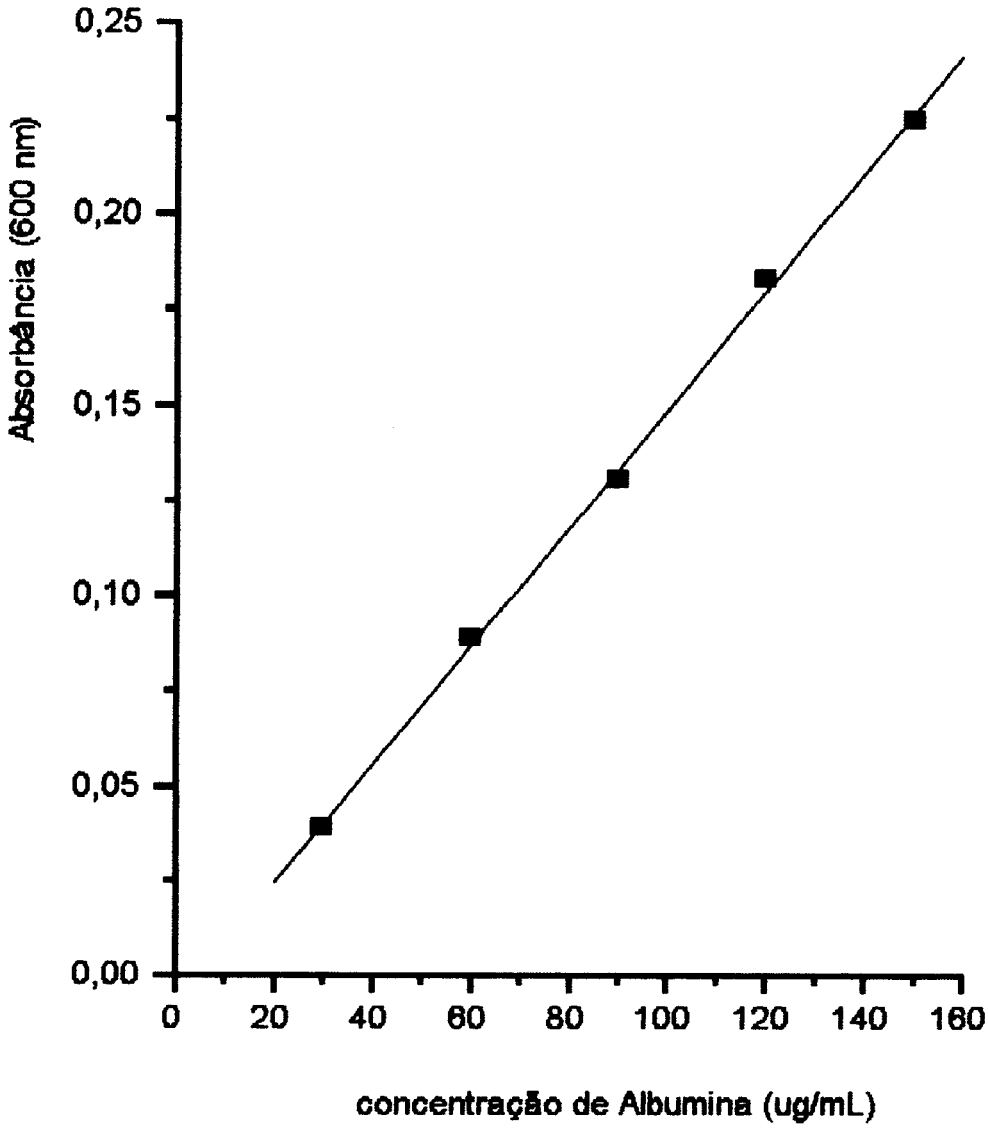

Figura 1 - Curva padrão para determinação da proteína pelo método de Lowry.

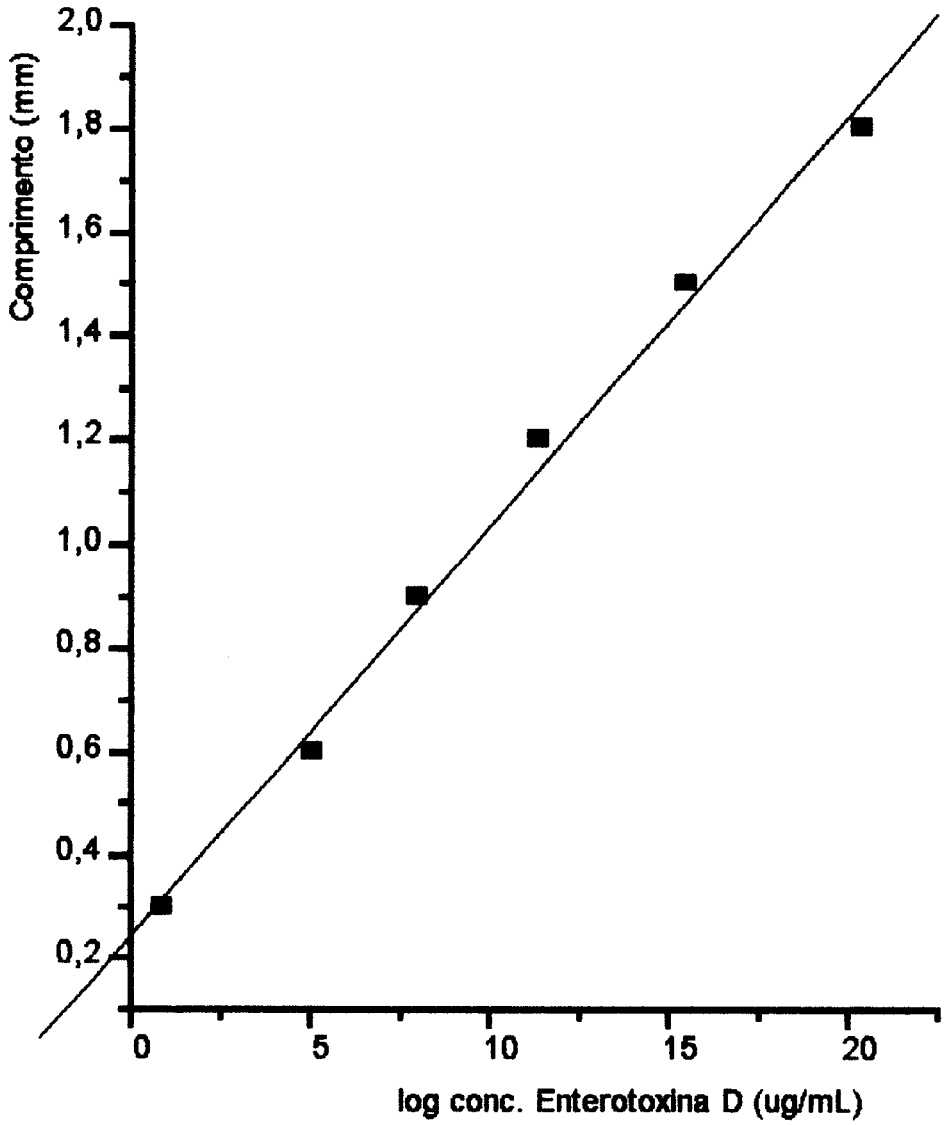

Figura 2 - Curva padrão para determinação de enterotoxina D pelo método de Oudin

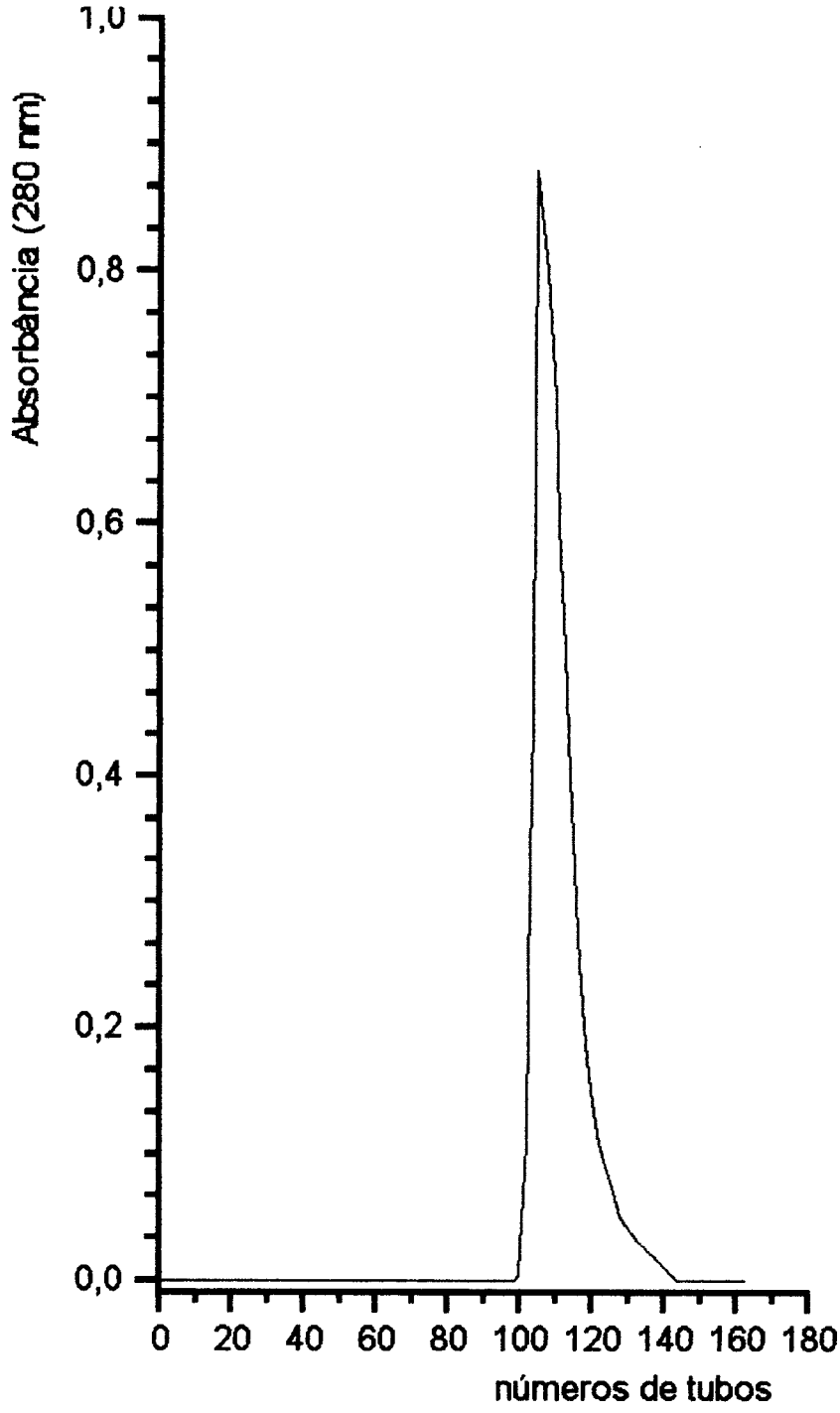

Figura 3 - Cromatografia da enterotoxina D (amostra contendo 60,89 mg de proteína total) em CM-Sepharose CL-6B (1,6 x 40,0cm) com tampão fosfato de sódio 0,03M a pH 6,0 e posteriormente a 0,045 M pH 6,4 a um fluxo de 0,32 mL/minuto.

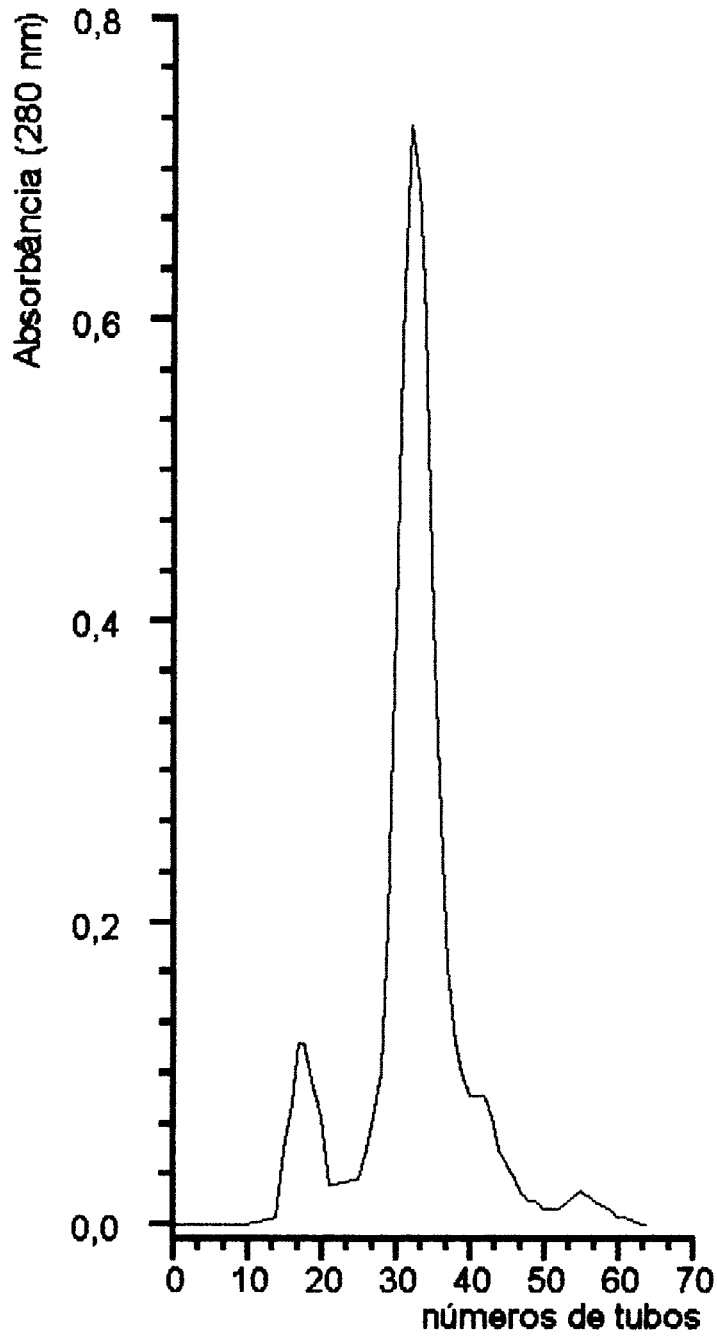

Figura 4 - Cromatografia da enterotoxina D (amostra contendo 16,24 mg de proteína total) em Sephadex G-75 (1,6 x 100 cm) com tampão fosfato de sódio 0,005M pH 6,8 contendo 0,5M de NaCl a um fluxo de 0,42 mL/minuto.

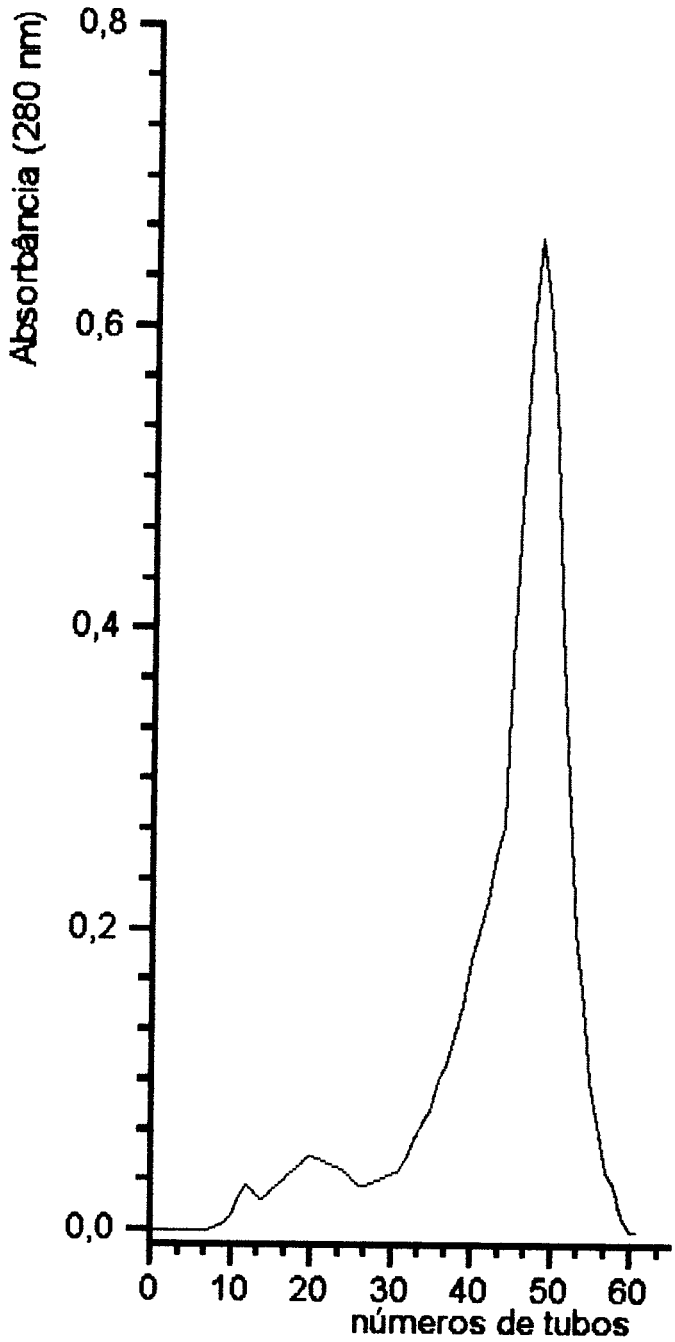

Figura 5 - Cromatografia do antissoro contra Enterotoxina Estafilocócoca D após precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ em coluna de 1,6 x 100 cm contendo Sephacryl S-200 a um fluxo de 0,42 mL/minuto com tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 9,6.

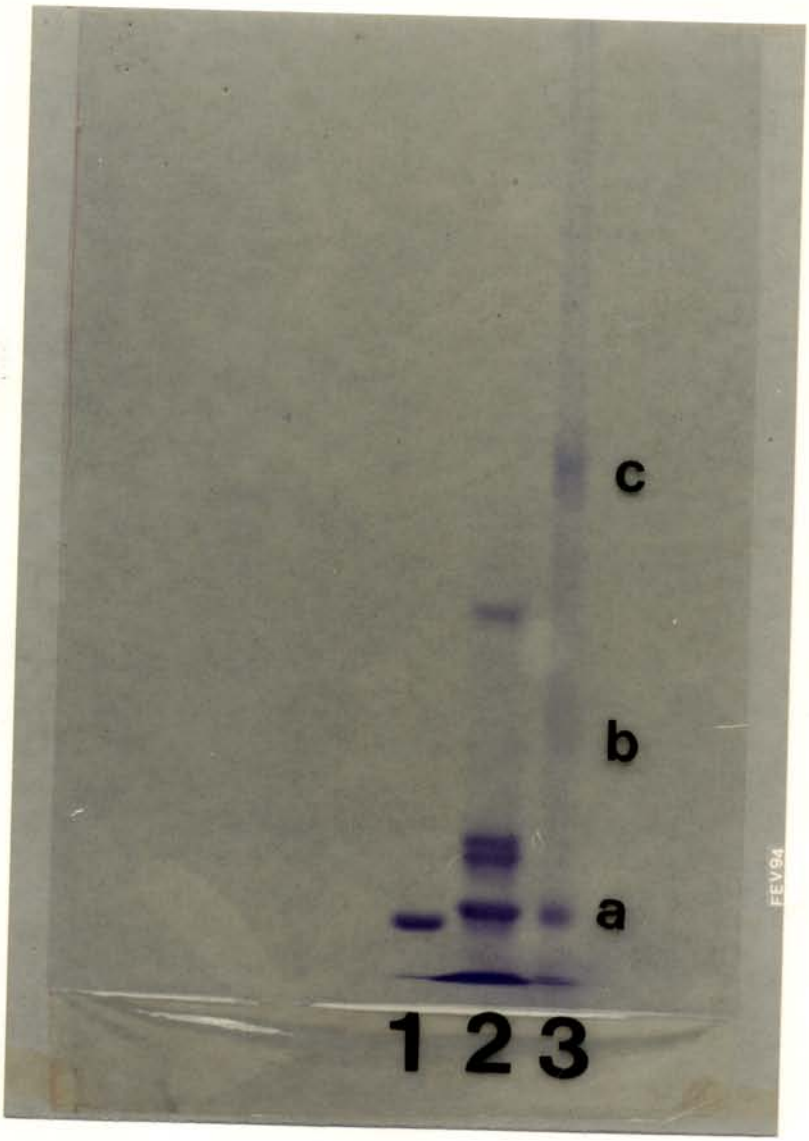

Figura 6 - Eletroforese em gel SDS.

1 - Enterotoxina D purificada no laboratório

2 - Enterotoxina D padrão FRI (Preparação Bruta)

3 - Padrão de Peso Molecular:

a - Anidrase Carbônica (30.000 daltons)

b - Ovalbumina (45.000 daltons)

c - Albumina Bovina (66.000 daltons)

VIII - APÊNDICE I

I - SOLUÇÕES ESTOQUES UTILIZADOS:

(a) Solução acrilamida - bisacrilamida

Acrilamida .....29,2 g

Bisacrilamida..... 0,8 g

H_2O..... 100 mL

(b) Tampão para o preparo do gel de separação

Tris .....18,5 g

H_2O ..... 100 mL

Ajustar para pH 8,8 com HCl

(c) Tampão para preparo do gel superior

Tris ..... 30 g

H_2O ..... 50 mL

Ajustar para pH 6,8 com HCl

(d) Dodecil Sulfato de sódio (SDS) 10%

SDS ..... 10 g

H_2O ..... 100 mL

(e) Persulfato de Amônio 10%

Persulfato de amônio ..... 0,5 g

H_2O ..... 50 mL

(f) Tampão do reservatório

Tris ..... 3 g

Glicina ..... 14,4 g

SDS ..... 1 mL da solução (d)

H_2O ..... 1000 mL

(g) Solução fixador

Coomassie Blue R-250 ..... 12,5 mL de solução 1%

Metanol ..... 50 mL

Ácido acético ..... 10 mL

H_2O..... 100 mL

(h) Solução descorante I

Metanol..... 50 mL

Ácido acético ..... 10 mL

H_2O .....100 m

(i) Solução descorante II

Ácido acético ..... 7 mL

Metanol ..... 5 mL

H_2O ..... 100 mL

(j) Solução Tampão para o tratamento da amostra

Tris..... 2,5 mL da solução (c)

SDS ..... 4,0 mL da solução (d)

glicerol ..... 2,0 mL

2-mercaptoetanol ..... 1,0 mL

H_2O .....10,0 mL