

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Estudo do Comportamento de linhagens de *S. Aureus* baixo produtoras de enterotoxina tipo D em meio de hidrolisado proteico, creme de confectaria e presunto cozido.

JOSÉ LUIZ PEREIRA
Engenheiro de Alimentos

PROFA. DRA. SONIA PRESA GAGGIANI DE SALZBERG
Orientadora

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

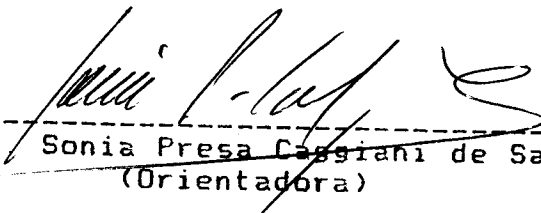
Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese de licenciatura por José Luiz Pereira e aprovada pela Comissão Orientadora em 02.05.90. Campinas
Campinas, 02 de maio de 1990. 1990

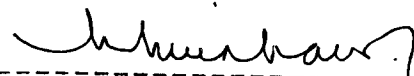
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

[Handwritten signature]

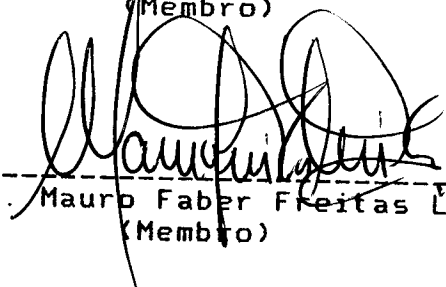
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Sonia Presa Cassiani de Salzberg
(Orientadora)

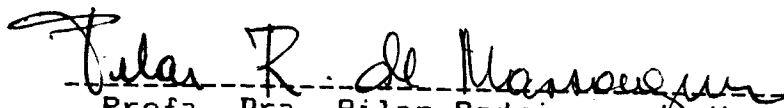


Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria
(Membro)

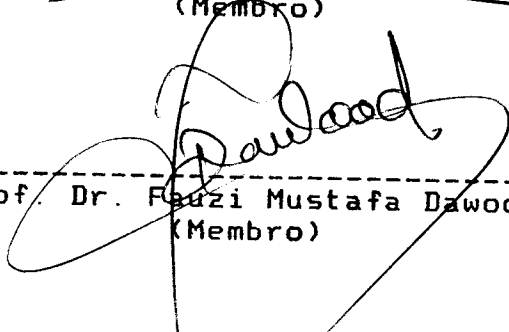


Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão
(Membro)

Prof. Yong Kun Park
(Membro)



Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Membro)



Prof. Dr. Fauzi Mustafa Dawood
(Membro)

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
(Membro)

22
20
20

às Mulheres de minha vida :

Dorotéa

Alexandrina

Sandra

Rosa

Flávia

Júlia

in memoriam

a meus queridos pais

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Merlin S. Bergoil pela efetiva colaboração neste trabalho, suprindo as necessidades de reagentes, linhagens e pela realização dos ensaios biológicos.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, Rosa, Jaqueline, Dona Terezinha, Dona Olívia, Dona Maria pelo apoio e colaboração.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos.

À colega Pilar pelo incentivo e apoio.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

À Márcia do Cemicamp pela eficiência, presteza e sugestões à composição e digitação final deste trabalho.

À Associação Brasileira da Indústria de Alimentos (ABIA) pelas cópias xerográficas do trabalho.

Agradecimentos Especiais

Agradeço sinceramente à Dra. Sonia pela amizade, dedicação, orientação e acima de tudo, pelo fato de ter-me introduzido na área de pesquisa, e por tantos anos de convivência em que não mediu esforços para me incentivar ajudando-me neste árduo caminho.

Agradeço profundamente à Norma, pela incansável dedicação, a quem devo muito na realização deste trabalho, além de sua amizade e apoio.

Agradeço à Telma, Secretária da Pós-Graduação, pelo estímulo, eficiência e amizade que tanto me auxiliou neste trabalho.

ÍNDICE

| ASSUNTO | PÁGINA |
|---|--------|
| Índice..... | 01 |
| Índice de Tabelas..... | 05 |
| Índice de Figuras..... | 08 |
| Resumo..... | 09 |
| Summary..... | 11 |
| I. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| II.1. Histórico..... | 16 |
| II.2. Revisão taxonômica da espécie <i>S. aureus</i> | 18 |
| II.3. Propriedades fisiológicas e bioquímicas da espécie <i>S. aureus</i> | 20 |
| II.4. Caracterização de enterotoxigenicidade..... | 22 |
| II.5. Incidência de <i>S. aureus</i> enterotoxigênico no homem e em alimentos..... | 24 |
| II.6. Enterotoxinas estafilocócicas..... | 29 |
| II.6.1. Estrutura molecular..... | 29 |
| II.6.2. Ação e dose emética das enterotoxinas..... | 32 |
| II.6.3. Reatividade imunológica..... | 35 |
| II.6.4. Estabilidade das enterotoxinas..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 11.6.5. Produção das enterotoxinas..... | 39 |
| 11.6.6. Purificação de enterotoxinas..... | 44 |
| 11.6.7. Análise das enterotoxinas..... | 45 |
| | |
| III. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 51 |
| | |
| III.1. Materiais..... | 51 |
| III.1.1. Organismos..... | 51 |
| III.1.2. Meios de cultura..... | 51 |
| III.1.3. Reagentes para testes bioquímicos..... | 52 |
| III.1.4. Reagentes para análise de enterotoxinas.... | 52 |
| III.1.5. Equipamentos específicos..... | 54 |
| III.1.6. Caracterização das culturas..... | 54 |
| | |
| III.2. Métodos..... | 56 |
| | |
| III.2.1. Estudo do comportamento das linhagens...56 | |
| III.2.1.a. Preparo e padronização do Inóculo..... | 56 |
| III.2.1.b. Culturas em frascos sob agitação..... | 57 |
| III.2.1.b.1. Preparo das amostras para a análise | |
| de enterotoxina..... | 58 |
| III.2.1.b.2. Análise quantitativa de enterotoxina | |
| D. método do ensaio imunoenzimático | |
| (ELISA)..... | 59 |
| III.2.1.b.2.a. Confeccção da curva padrão..... | 59 |
| III.2.1.b.2.b. Análise das amostras..... | 61 |

| | |
|---|----|
| 111.2.1.c. Culturas obtidas pelo método de crescimento utilizando-se sacos de diálise (96)..... | 62 |
| 111.2.1.c.1. Preparo das amostras para a análise de enterotoxinas..... | 62 |
| 111.2.1.c.2. Análise semi-quantitativa - método de "Placas de Sensibilidade Ótima" (O.S.P.) Modificação do método de Ouchterlony..... | 63 |
| 111.2.2. Estudo do comportamento das linhagens em alimentos..... | 64 |
| 111.2.2.a. Estudo do comportamento das linhagens em creme de confeitaria..... | 65 |
| 111.2.2.a.1. Preparo do creme..... | 65 |
| 111.2.2.a.2. Inoculação do creme..... | 66 |
| 111.2.2.a.3. Contagem da flora mesófila e <i>S. aureus</i> nas amostras de creme..... | 66 |
| 111.2.2.a.4. Determinação de enterotoxina estafilocócica tipo D em creme..... | 67 |
| 111.2.2.b. Estudo do comportamento das linhagens em presunto cozido..... | 67 |
| 111.2.2.b.1. Preparo do presunto..... | 67 |
| 111.2.2.b.2. Inoculação do presunto..... | 68 |
| 111.2.2.b.3. Contagem da flora mesófila e nas amostras de presunto (2)..... | 68 |

| | |
|---|-----|
| III.2.2.b.4. Determinação de enterotoxina estafilocócica..... | 68 |
| IV. RESULTADOS..... | 69 |
| IV.1. Caracterização das culturas de <i>S. aureus</i> | 69 |
| IV.2. Culturas em frascos sob agitação..... | 69 |
| IV.3. Culturas obtidas pelo método de crescimento utilizando-se saco de diálise..... | 70 |
| IV.4. Produção de enterotoxina estafilocócica D em cremes de confeitaria..... | 72 |
| IV.5. Produção de enterotoxina estafilocócica D em presunto cozido..... | 75 |
| V. DISCUSSÃO..... | 78 |
| VI. CONCLUSÕES..... | 84 |
| VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |
| TABELAS..... | 108 |
| FIGURAS..... | 119 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Crescimento das linhagens de <i>S. aureus</i> em frascos de meio TEL sob agitação de 250 rpm a 37o C | 108 |
| Tabela 2 - Produção de enterotoxina estafilocócica D em frascos de meio TEL sob agitação de 250 rpm a 37o C | 109 |
| Tabela 3 - Taxa de produção de enterotoxina estafilo- cócica D em frascos de meio TEL sob agitação de 250 rpm a 37o C | 110 |
| Tabela 4 - Produção de enterotoxina estafilocócica D em culturas obtidas pelo método de saco de diálise em meio TEL, sob agitação de 250 rpm a 37o C | 111 |
| Tabela 5 - Produção de enterotoxina estafilocócica D em culturas obtidas pelo método de saco de diálise com meio TEL, sob agitação de 250 rpm a 37o C | 112 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 6 - Taxa de produção de enterotoxina estafilocócica D em frascos culturas obtidas pelo método de diálise em meio TEL, sob agitação de 250 rpm a 37o C | 113 |
| Tabela 7 - Comparação entre a produção de enterotoxina estafilocócica D pelos métodos de cultura com saco de diálise e em frascos utilizando-se meio TEL, sob agitação de 250 rpm e a 37o C | 114 |
| Tabela 8 - Relação entre crescimento e produção de enterotoxina D em creme inoculado com 10 ³ células/g de <i>S. aureus</i> após 24 horas de incubação a diferentes temperaturas | 115 |
| Tabela 9 - Relação entre crescimento e produção de enterotoxina D em creme inoculado com 10 ⁴ células/g de <i>S. aureus</i> após 24 e 48 h de incubação a diferentes temperaturas | 116 |
| Tabela 10- Relação entre crescimento e produção de enterotoxina D em presunto cozido com 10 ³ células/g de <i>S. aureus</i> após 24 e 48 h de incubação a diferentes temperaturas | 117 |

Tabela 11- Relação entre crescimento e produção de enterotoxina D em presunto cozido com 10^4 células/g de *S. aureus* após 24 e 48 h de incubação a diferentes temperaturas 118

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Curvas padrao para crescimento das linhagens de *S. aureus* utilizando-se meio TEL, pH 7.0 e a 37o C 119
- Figura 2 - Crescimento das linhagens de *S. aureus* em frascos de meio TEL sob agitação de 250 rpm a 37o C 120
- Figura 3 - Curva padrão para enterotoxina D utilizando-se como diluentes meio TEL e sobrenadantes de extratos de creme e presunto cozido 121
- Figura 4 - Produção de enterotoxina estafilocócica D em frascos de meio TEL, sob agitação de 250 rpm a 37o C 122
- Figura 5 - Produção de enterotoxina estafilocócica D em culturas obtidas pelo método de saco de diálise com meio TEL, sob agitação de 250 rpm a 37o C 123

RESUMO

O trabalho visou o estudo do comportamento de quatro linhagens de *S. aureus* baixo produtoras de enterotoxina D e uma linhagem padrão em meio de laboratório e em alimentos, creme de confeitaria e presunto cozido. As técnicas empregadas para cultivo das células e produção de toxina foram a de crescimento em frascos eilenmeyer e a de saco de diálise, ambas utilizando como meio de cultivo caldo de triptona 3% e extrato de levedura 1% ajustado a pH 7.0. As culturas foram incubadas a 37o C e o crescimento e produção de enterotoxina foram analisados no período de 8 a 48 horas de incubação, utilizando-se o método padrão de contagem em placas para a determinação da concentração celular e os métodos de dupla difusão em gel e o ensaio imunoenzimático (ELISA) para as determinações semi-quantitativas e quantitativas respectivamente da enterotoxina produzida.

Os alimentos utilizados como substrato para as culturas foram : creme de confeitaria e presunto cozido. Cada um destes produtos foram separados em dois lotes, um estéril e outro não esterilizado, inoculados com concentrações de 10^3 e 10^4 microrganismos/g produto, das cinco linhagens em estudo e incubados a 25, 30 e 37o C por um período de 48 horas. As amostras foram coletadas após 24 e

48 horas para a determinação do número de microrganismos mesófilos e de *S. aureus* e para a análise de enterotoxina D. Os resultados obtidos revelaram que o método de saco de diálise apresentou um rendimento nove vezes superior ao encontrado em frascos, para todas as linhagens. A taxa de máxima produção de toxinas para as linhagens baixo produtoras ocorreu entre 16 e 20 horas com valores médios de 4,5 ng/mL/h pelo método de cultura em frascos e 38,0 ng/mL/h pela técnica de saco de diálise. A análise de toxina por difusão em gel permitiu determinações de toxina a partir de 2,0 ug/mL. Os resultados encontrados em creme não esterilizado mostraram que a 25o C e 48 horas de incubação ocorreu a produção de toxina com uma das linhagens baixo produtoras na concentração de 1,2 ng/g, sendo que às 24 horas registrou-se a presença de toxina em níveis de 1,5 ng/g somente nas amostras incubadas a 37o C. A comparação entre as contagens de amostras de creme esterilizado e não esterilizado, mostraram a ocorrência de competição entre a microflora natural e as culturas de *S. aureus*, uma vez que os cremes esterilizados sempre apresentaram contagens de *S. aureus* e concentração de toxina superior aos não esterilizados. O comportamento das linhagens em presunto foi similar ao encontrado em creme.

SUMMARY

The goal of this investigation was to determine whether staphylococcal strains producing enterotoxins at nanogram levels per milliliter, not detectable by gel diffusion methods, could produce sufficient enterotoxin in foods to result in food poisoning. Four low enterotoxin D producing strains were selected for this research because enterotoxin D is produced in smaller amounts than are the other enterotoxins. In the control experiments, the staphylococcal strains were incubated in 3% triptone broth plus 1% yeast extract, pH 7.0, in shake-flasks and by the sac culture method at 37° C. Growth and enterotoxin production were monitored after 8, 12, 16, 20, 24, and 48 hours incubation using the standard plate count method for cell count and the methods of gel diffusion and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative and quantitative enterotoxin determination, respectively. The foods used as substrate for the cultures were cream pie and cooked ham. These foods were divided into two portions, sterile and non-sterile. Each were inoculated with known concentrations of the staphylococcal strains under study and incubated for 48 hours at 25, 30, and 37° C. Samples were taken after 24 and 48 hours for mesophilic and staphylococcal cell counts and for enterotoxin analysis. Nine times as much enterotoxin was produced by all strains by the sac culture method than was produced by the shake-

flask method. The maximum toxin production by the low-enterotoxin producing strains was between 16 and 24 hours with values of 4.5 ng/ml/h by the shake-flask method and 38.0 ng/ml/h by the sac culture method. Enterotoxin production was not detectable by gel diffusion. Enterotoxin was detectable in both sterilized and unsterilized cream and ham after 24 hours incubation at 37o C and in the sterilized foods after incubation for 24 hours at 30o C with an inoculum of 10^3 / g. Some strains produced detectable amounts of enterotoxin in the unsterilized foods after incubation for 24 hours at 30o C and some produced detectable amounts of enterotoxin in the sterilized foods after incubation for 24 hours at 25o C with inocula of 10^4 / g. Additional amounts of enterotoxin were produced by incubation for 48 hours. It can be concluded that staphylococcal strains producing enterotoxin at ng/ml levels in laboratory medium, not detectable by gel diffusion, can produce sufficient enterotoxin (ng/g) in foods to result in food poisoning.

I. INTRODUÇÃO

O estudo das enterotoxinas estafilocócicas é de extrema importância para uma efetiva avaliação das condições higiênicas de alimentos susceptíveis ao desenvolvimento de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, bem como dos processos a que foram submetidos desde os estágios de matéria-prima até distribuição e consumo. Assim, à medida que a indústria de alimentos se desenvolve, o controle direto das enterotoxinas se torna indispensável.

A análise microbiológica de alimentos, mesmo revelando a ausência de células de *S. aureus*, não é uma medida suficiente para declará-los apropriados ao consumo, como pode ser observado facilmente através de surtos cujo veículo tenha sido leite previamente pasteurizado, produtos de laticínio, ou até mesmo embutidos cárneos (32,38,45).

Com relação a análises de enterotoxinas, entre os métodos mais sensíveis disponíveis atualmente, o que vem se tornando mais viável e encontrando uma receptividade cada vez maior entre vários laboratórios é o "Enzyme linked immunosorbent antibody technique - ELISA". Com este método é possível se detectar concentrações mínimas de toxina, da ordem de 1 ng/ml (39,42). Em contraposição ao método de imunodifusão em lâmina que além de permitir a análise

de enterotoxinas a níveis de 100 ng/mL (64), depende de um tempo longo de análise, de 3 a 5 dias, e requer técnicos experientes e treinados (38). O método de radioimunoensaio, apresenta uma sensibilidade alta, semelhante ao método de ELISA, porém necessita de infraestrutura adequada pelo fato de utilizar substâncias radioativas e apresenta um custo muito elevado à maioria dos laboratórios de controle e até mesmo aos de pesquisa (112).

A única análise definitivamente conclusiva a que se pode submeter extratos livres de células de culturas de *S. aureus* suspeitos, de enterotoxigenicidade é o ensaio biológico utilizando-se macacos Rhesus, já que são consideradas enterotoxinas quaisquer substâncias que quando administradas intragastricamente provoquem reação emética nos animais, mesmo que não apresentem reações positivas em nenhum dos métodos sorológicos existentes (64).

Cepas de estafilocócos produtoras de enterotoxina D são a causa de numerosos surtos de intoxicação alimentar. A quantidade de enterotoxina D produzida pela maioria das linhagens específicas é de aproximadamente 1/5 quando comparada à produzida pelas linhagens tipicamente produtoras de enterotoxina A, fato este que contribui para aumentar a dificuldade na identificação de cepas produtoras de pequenas quantidades de enterotoxina D (38).

Assim, estas cepas, são de indiscutível interesse, uma vez que diminutas concentrações, ao redor de 100 a 200 ng de toxina, são suficientes para intoxicar indivíduos sadios, especialmente jovens e idosos (38). Este fato é significativo porque frequentemente cepas isoladas de alimentos após mostrarem-se incapazes de produzir alguma das enterotoxinas conhecidas, usualmente são descartadas e consideradas não enterotoxinogênicas.

Neste trabalho, utilizamos algumas dessas cepas consideradas inicialmente como não produtoras de enterotoxinas, inoculadas em cremes do tipo utilizado em produtos de pastelaria e em presunto cozido, e submetidas a incubação durante 48 horas, sendo a seguir analisadas pelo ensaio de ELISA.

Também foram estudados alguns aspectos referentes à relação entre concentração celular e produção de toxinas quando as culturas foram submetidas a crescimento em meios de hidrolisados proteicos sob diferentes técnicas de cultivo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Histórico

Grande número de trabalhos têm sido publicados com relação à classificação taxonômica de *Staphylococcus aureus* (51, 65) desde que em 1871 Von Recklinhausen descreveu pela primeira vez a presença de microrganismos em forma de cocos Gram positivos, isolados a partir de exudatos purulentos de origem humana. Este fato também foi observado alguns anos mais tarde, em 1878, por Koch (20), e já em 1880 Luiz Pasteur conseguiu cultivar estes microrganismos em meio líquido sendo os mesmos testados posteriormente por Ogston na Escócia em cobaias e camundongos, quando se confirmou sua patogenicidade em animais.

Além da importância em processos infecciosos o *S. aureus* apresenta um papel de destaque na área de higiene e alimentos. A intoxicação por enterotoxinas, raramente fatal, apresenta um quadro clínico onde predominam os vômitos incoercíveis e mal estar generalizado, após um período de incubação entre 1 a 6 horas. Este quadro pode ser agravado, quando indivíduos muito jovens, idosos ou fisiologicamente debilitados são expostos à ação destas toxinas, sendo nestes casos necessária a hospitalização dos pacientes para recuperação e reposição de volume e eletrólitos. Nestas circunstâncias pode ocorrer presença de

sangue no vômito, cólicas abdominais intensas, acompanhadas de espasmos musculares, diarréia e cefaléia, ocasionando também prostração generalizada do indivíduo, acompanhada de hipotensão arterial e hipotermia. No entanto estes sintomas desaparecem rapidamente durante as próximas 24 horas (10).

Os casos onde a intoxicação estafilocócica, realmente assume riscos graves, em geral estão restritos a possíveis acidentes que venham a ocorrer em laboratórios que trabalham com purificação e produção de antissoros, onde frequentemente são manipuladas concentrações extremamente elevadas de enterotoxinas (*).

(*) Bergdoll, M.S. Informação pessoal.

II.2 Revisão taxonômica da espécie *S. aureus*

A seção XII da 1a. ed do Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey (195) consiste de 15 diferentes gêneros que são poligenética e fenotipicamente diferentes. Estes apresentam poucas características morfo-fisiológicas em comum (cocos Gram positivos, quemorganotróficos, mesófilos e não esporulados). As principais características utilizadas para diferenciar esses gêneros são: tipo de arranjo celular, necessidade de oxigênio, e catalase. Assim a presença ou ausência de catalase e citocromos separa os cocos Gram positivos em apenas dois grupos. A família *Micrococcaceae*, *Deinococcaceae* e membros do gênero *Stomatococcus* possuem catalase ou citocromos ou ambos, enquanto que em todos os outros gêneros estas características estão ausentes, podendo virtualmente apresentar fraca atividade para a degradação de água oxigenada, característica de reação de pseudocatalase.

A família *Micrococcaceae* é composta de quatro gêneros, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* e *Planococcus*. O gênero *Staphylococcus* está subdividido em dezenove espécies reconhecidas e existem ainda outras espécies sob investigação. O gênero pode ser dividido em pelo menos quatro espécies - grupo conforme a relação de homologia de DNA e características fenotípicas, e são elas *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* e

S. sciuri. Já as espécies *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. caseolyticus* não podem ser alocadas em qualquer das espécies-grupo acima mencionadas e ao mesmo tempo são muito pouco relacionadas entre si para se constituírem em um novo grupo.

II.3 Propriedades fisiológicas e bioquímicas do gênero *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são microrganismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase fortemente positiva, não móveis, não fotossintéticos e não formadores de esporos. Muitas linhagens produzem pigmentos amarelos ou alaranjados, particularmente em meios contendo cloreto de sódio. A maioria das linhagens forma acetoina de glucose e amônia de arginina, reduzem nitratos a nitritos e fermentam uma variedade de carboidratos produzindo ácido e não gás; não formam indol e podem acidificar o Litmus Milk (75). Os ensaios de coagulase e termonuclease são usualmente utilizados para identificação de cepas de *S. aureus*, dando reações positivas em poucas horas de incubação, bem como a presença de hemolisinas (32).

Os estafilococos são mesófilos, que crescem melhor em condições aeróbias. A temperatura ótima de crescimento é de 37o C, podendo algumas linhagens apresentarem valores de 39,4o C (88) e a temperatura mínima onde ainda foi possível se detectar crescimento é de 10o C (75). Em meios de composição definida, os membros deste gênero necessitam de aminoácidos como fonte de nitrogênio e algumas vitaminas como cofatores de crescimento (29). Estes organismos crescem muito bem em meios complexos como a infusão de cérebro e coração (BHI) e vários outros, além de hidrolisados

proteicos. A maioria das linhagens crescem e se desenvolvem na presença de sais, até 15% de NaCl (59). De maneira geral as linhagens patogênicas apresentam maior tolerância aos sais, como o cloreto de lítio, telurito de potássio, cianetos e azida sódica, assim como aos antibióticos, como polimixina e penicilina (111). Um dos meios de isolamento mais amplamente utilizado é o de Baird-Parker (2, 111). Consiste de um meio básico de ágar acrescido de gema de ovo e agentes inibidores e seletivos.

II.4 Caracterização de enterotoxigenicidade

Muitas características bioquímicas de culturas de estafilococos, são tidas como indicativas de sua enterotoxigenicidade, mas nenhuma característica ou combinação de características é suficiente para a confirmação desta propriedade. A característica mais amplamente utilizada é a reação de coagulase (2). Este ensaio indica a presença ou ausência de uma enzima capaz de coagular plasma citratado ou oxalatado de coelho, suino ou humano. Estudos realizados mostraram uma alta correlação entre a presença de enterotoxina e da enzima coagulase, porém existem algumas linhagens toxigênicas coagulase negativa (17, 84).

Alguns pesquisadores sugeriram a presença de desoxirribonuclease termo-estável como indicativo de enteropatogenicidade (86). Outra característica que tem sido considerada como indicativa de enteropatogenicidade é a produção de proteína A, uma vez que 98% das linhagens de estafilococos coagulase positivos, produzem esta proteína (40).

Até pouco tempo, linhagens enterotoxigênicas e que apresentavam resultados negativos ao teste de coagulase eram consideradas como variantes ou mutantes de *S. aureus*, uma vez que a capacidade de produzir enterotoxina era usada como

um critério taxonômico na classificação de *S. aureus* (69). Entretanto esta forma de classificação é discutível, pois não estabelece a identidade das espécies desses organismos através de linhagens referência e homologia de DNA (1).

Posteriormente alguns pesquisadores (33) estabeleceram uma nova espécie denominada *S. hyicus* contendo duas subespécies, *hyicus* e *chromogenes* que podem apresentar coagulase variável e termonuclease positiva para a subespécie *hyicus*, enquanto que para a segunda tanto a coagulase quanto a termonuclease são ausentes. Estudos recentes onde cinco linhagens de *S. hyicus* foram testadas sorologicamente para sua capacidade de produzir algum tipo de enterotoxina e submetidas a ensaios biológicos com macacos, revelaram que nenhuma delas produziu algum tipo de enterotoxina; entretanto todas as cinco cepas provocaram emese em pelo menos 2 de 6 animais utilizados, fato este até o presente sem elucidação conclusiva (1).

A atividade proteolítica e lipolítica, produção de fosfatase, redução de nitrato, fermentação de carboidratos e sensibilidade a antibióticos não tem aparentemente relação com a produção de coagulase, termonuclease e enterotoxina (75).

II.5 Incidência de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no homem e em alimentos

A real incidência de intoxicação estafilocócica em várias partes do mundo não está bem estabelecida, uma vez que esta enfermidade não é relatada aos serviços médicos e sanitários em muitos países. No entanto em alguns deles como ocorreu na Hungria no ano de 1974, do total dos surtos de intoxicação alimentar, 40% (10) foram atribuídos à ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas; este dado no entanto é relativamente alto quando comparado com valores de 20-25% dos casos registrados no Japão e 25-30% nos EUA (8, 77, 10).

Segundo dados do Center for Disease Control (CDC), os *Staphylococcus* representam o segundo agente etiológico mais frequente em surtos de toxinfecções alimentares, precedidos apenas por *Salmonella* (35, 34, 36, 37).

A razão fundamental que impede a confirmação dos surtos, é a falta de infra-estrutura para uma determinação rápida e efetiva da presença de toxinas nos alimentos suspeitos.

A incidência de *S. aureus* enterotoxigênico e suas enterotoxinas em diversos alimentos no Brasil, tem sido constatada por alguns pesquisadores, porém a ocorrência de surtos apresenta-se mal documentada, acarretando dificuldades para uma análise estatística mais acurada em relação à incidência de toxinfecções alimentares (44).

Estudos realizados por Iaria e colaboradores (57) realizados em manipuladores de alimentos em hospitais da cidade de São Paulo, evidenciaram que 35,3% dos indivíduos examinados eram portadores de *S. aureus* nas fossas nasais e destes 16,7% revelaram-se portadores de cepas produtoras de enterotoxina C, observando-se uma alta incidência na população. Outro trabalho realizado com alimentos, pelo mesmo grupo, utilizando doces cremosos de confeitaria na cidade de São Paulo (56), mostra que a incidência de *S. aureus* foi de 38% e que destes 18,4% eram capazes de produzir enterotoxinas, predominando a do tipo C, seguida dos tipos B e D.

Esta situação não ocorre somente no Brasil mas também nos demais países Latino Americanos (95, 46).

É bem conhecida a participação de portadores de *S. aureus* na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica. A colonização nasal por *S. aureus* em humanos é descrita frequentemente e uma grande

proporção de pessoas sadias mantem este microorganismo em suas fossas nasais, constituindo-se em seu maior reservatório (aproximadamente 30 a 50% dos adultos são portadores) (99). Este pode ser um fator agravante quando houver contato direto com alimentos através de manipuladores, como no caso de indústrias de carne. Foi demonstrado que 42% de um total de 86 empregados de frigoríficos e indústrias de carne na Suécia, considerados clinicamente sadios, eram portadores de cepas enterotoxigênicas (28, 25).

Um levantamento realizado em uma população hospitalar por Henning revelou uma porcentagem ao redor de 32 e 30% de *S. aureus* enterotoxigênico em fossas nasais e garganta respectivamente (47, 48, 89). Existem também dados na literatura que indicam taxas mais elevadas como 82% para pessoas com algum tipo de infecção respiratória, prevalecendo a presença de enterotoxinas tipo A, B ou ambas, com predominância de enterotoxina B (68%) (9). Por outro lado Reall e colaboradores analisando alimentos e indivíduos revelaram que 38% de pessoas sadias e 45% de pessoas com lesões cutâneas apresentavam cepas produtoras de enterotoxina A, e 42,8% de cepas toxigênicas encontradas em pessoas com infecção apresentavam predominância de enterotoxina C (83).

Nos primeiros levantamentos realizados por Casman (23) e por Simkovicova e colaboradores (103) nos Estados Unidos ficou constatada uma incidência de 96,2% de cepas enterotoxigênicas em relação às demais. Estudos mais recentes de Payne e colaboradores (87) indicaram que 62,5% dos microrganismos isolados de alimentos produziram algum tipo de enterotoxina e no caso específico da enterotoxina a incidência constatada por esses pesquisadores foi de 47,2%. Em trabalhos realizados com produtos cárneos no Brasil, por Hirooka este valor foi de 42,7% (49). Estudos realizados em alimentos prontos para consumo por Adesiyun (1) mostraram que 39,1% das linhagens pesquisadas eram toxigênicas apresentando uma frequência de 44,3% para a enterotoxina D.

Em um trabalho realizado na região de Campinas em 1976, foi possível analisar 128 amostras de macarrão, sendo que 69,5% revelaram a presença de *S. aureus* e destas 63% foram confirmadas como enterotoxigênicas com predominância de enterotoxina A em níveis de 31% (31).

Alguns dados levantados com carne enlatada para exportação, do Brasil, mostraram que em um lote, pelo menos 6 latas estavam contaminadas e em pelo menos 4 delas foi possível se isolar organismos capazes de produzir enterotoxina estafilocócica tipo A (71).

Alguns outros alimentos nos quais foi possível isolar *S. aureus* enterotoxigênicos foram:

- a) camarões, onde se obteve contagens elevadas ao redor de 10^7 UFC/g, sendo a enterotoxina A produzida por 48% e B por 35% (4), valores estes encontrados na Holanda;
- b) leite e queijos no México, onde a partir de 100 amostras foram isoladas 400 cepas de *S. aureus* sendo 42% enterotoxigênicas e dentre estas 45% produziram enterotoxina A e 33% enterotoxina D (95, 46).

II.6 Enterotoxinas estafilocócicas

II.6.1 Estrutura molecular

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas formadas por uma simples cadeia polipeptídica e que apresentam um peso molecular de 26.000 a 30.000 D. Sete enterotoxinas distintas foram identificadas e diferenciadas em suas reações imunológicas: enterotoxina A(19), B(16), C1 e C2(12), C3(93), D(23), E(13). A identificação das enterotoxinas é feita por suas reações com anticorpos específicos (24): no caso das enterotoxinas do grupo C, elas reagem com o mesmo anticorpo principal mas cada uma tem anticorpos específicos, que permitem assim a identificação e isolamento (68), indicando que as estruturas individuais das enterotoxinas C são diferentes.

O princípio do método biológico de identificação das enterotoxinas baseia-se no fato de provocarem emese em macacos, quando o sobrenadante de uma cultura após o crescimento de uma cepa de estafilococos é introduzido intragastricamente nestes animais. Emese é o principal sintoma observado em uma intoxicação alimentar estafilocócica e, desta forma, qualquer metabólito produzido pelo microrganismo que seja capaz de produzir este sintoma é considerado como enterotoxina: assim, certamente muitas enterotoxinas desconhecidas devam existir.

A análise de cepas implicadas em intoxicação alimentar indica que cerca de 5% dos surtos é resultado da ação destas substâncias. Outro fato a considerar são as pequenas quantidades de toxinas produzidas por diversas linhagens dificultando assim sua purificação e análise.

Das enterotoxinas a única cujo peso molecular é conhecido com precisão é a do tipo B uma vez que toda a sequência de aminoácidos é conhecida e seu valor é de 28.366 d. (52,53).

Existem diferenças entre os pontos isoeletricos das diferentes enterotoxinas detectados pelos métodos de focalização isoeletrica onde mais do que uma fração é obtida, com diferenças de aproximadamente 0,4 unidades de pH entre eles. As enterotoxinas contém quantidades relativamente grandes de lisina, ácido aspártico, glutâmico e tirosina e apresentam apenas dois resíduos de meia cistina. Há diferenças nas quantidades de vários resíduos em suas estruturas, porém sem que haja qualquer significância, a não ser uma provável relação com o estabelecimento dos sítios antigênicos (10). O estudo da sequência de aminoácidos em enterotoxina B revelou a presença de 239 resíduos, apenas dois resíduos de cisteína estão presentes e se localizam aproximadamente no centro da cadeia, nas posições 92 e 112 (53); como não há grupos SH livres na

enterotoxina B, as duas meia cistina estão unidas em um resíduo de cisteína (8).

Aparentemente a alça de cistina é uma estrutura comum às enterotoxinas uma vez que todas elas contém apenas dois resíduos de meia cistina. A sequência de aminoácidos da alça de cistina pode ser diferente para cada enterotoxina, como é o caso da enterotoxina A e B. Alguns pesquisadores atribuem a esta região da molécula o sítio de toxicidade, uma vez que a alça de cistina sempre está presente nas enterotoxinas (54).

II.6.2 Ação e dose emética das enterotoxinas

O quadro clínico apresentado por indivíduos que tenham ingerido enterotoxinas estafilocócicas como já anteriormente mencionado, é característico, já que a enfermidade é aguda e auto-limitada com completo restabelecimento entre 24 a 72 horas (9).

A sintomatologia das intoxicações estafilocócicas é conhecida, porém seu modo de ação no homem não está perfeitamente esclarecido, visto que esta enfermidade nunca é fatal, impossibilitando assim a comprovação anatomopatológica de seus efeitos (10).

O alvo de ação das enterotoxinas é o trato digestivo, mas outras alterações na pressão arterial e temperatura indicam a passagem das enterotoxinas do estômago e trato intestinal para o sistema circulatório ainda que em níveis muito baixos (27). Com o advento de métodos mais sensíveis como radioimunoensaio e ensaio imunoenzimático (15), foi possível a detecção de enterotoxinas em amostras de sangue. Outra evidência da passagem da toxina para a corrente circulatória está baseada no fato de que se pode observar o desenvolvimento de resistência em macacos às enterotoxinas quanto estes as recebem por via intragástrica (7).

A absorção da enterotoxina se dá na mucosa gastrintestinal intacta e em aproximadamente 15 minutos é possível detectá-la em tecido renal ligada a imunoperoxidase em neutrófilos e macrófagos glomerulares e do duodeno. A eliminação ocorre também rapidamente, uma vez que 180 minutos após a exposição do animal não é possível se determinar qualquer componente antigênico nas amostras de sangue (18).

Através de estudos em animais de laboratório, macaco rhesus, concluiu-se que o vômito é provocado por estimulação de receptores eméticos localizados no trato gastrintestinal e transmitido ao centro do vômito via vago e nervos simpáticos (9). Este fato pode ser observado após ensaios em animais vagotomizados que respondiam parcialmente à ação das enterotoxinas quando administradas intragastricamente. Já a simpatectomia abdominal dos animais conferiu uma proteção completa (11).

Estudos com voluntários, mostram que 20 a 25 ug de enterotoxina B pura, ou seja, 0,4 ug/Kg de peso corporal, podem provocar quadros clínicos típicos de intoxicação alimentar. O estudo de um surto de intoxicação alimentar ocorrido em Madison, Wis, USA, envolvendo uma população de estudantes de segundo grau, revelou que o alimento veículo foi leite achocolatado, distribuído em embalagens individuais acartonadas de aproximadamente 250 mL. A análise

de enterotoxinas no leite, revelou índices médios de 94 a 184 ng de enterotoxina A por embalagem e a razão de ataque foi de 31,5% para os jovens que consumiram apenas um pacote de leite, 38,2 para os que consumiram dois e 45% para aqueles que consumiram de dois a três pacotes. Assim foi possível concluir que 200 ng ou menos de enterotoxina A pode provocar intoxicação em indivíduos sensíveis (38).

II.6.3 Reatividade imunológica

As enterotoxinas apresentam reações imunológicas cruzadas entre si, indicando que podem ser divididas em grupos segundo a possibilidade de reações cruzadas dentro de um mesmo grupo, mas não entre grupos distintos (10). As enterotoxinas estruturalmente mais semelhantes são as do grupo C, assim C1, e C2 possuem determinantes antigênicos comuns e outros específicos (68). Sabe-se atualmente que a enterotoxina C3 reage com o anticorpo principal para enterotoxina C1 e C2 mas a reação indica que os sítios antigênicos na enterotoxina C3 responsáveis por esta reação não são idênticos àqueles das outras enterotoxinas do grupo C. A evidência para a reatividade imunológica cruzada entre as enterotoxinas é o fato de que alguns antissoros preparados contra B contém anticorpos capazes de reagir também com as enterotoxinas Cs, assim anticorpos obtidos por cromatografia de afinidade reagem com enterotoxina B, C1, e C2 como se fossem uma única toxina. Atualmente existem preparações de anticorpos específicos para enterotoxina B, anticorpos que reagem com ambas as toxinas C1 e C2 de forma idêntica e anticorpos específicos para cada uma delas (68).

No caso da enterotoxina E, são observadas reações com enterotoxina A, tendo cada toxina seu principal anticorpo e um outro secundário comum sempre presente nos respectivos antissoros (13, 67). A enterotoxina D não reage

de forma cruzada com os anticorpos comuns a enterotoxina A e E, mas existem evidências de que alguns antissoros devam conter anticorpos que reajam com todas as três enterotoxinas.

Alguns autores (106) obtiveram fortes reações de enterotoxinas B e C com anticorpos heterólogos mas a quantidade de soro necessária foi quatro vezes maior do que a utilizada para as séries homólogas. Foi proposto que um dos três principais determinantes antigênicos dessas enterotoxinas possui uma significativa similaridade, mas provavelmente sua estrutura não seja idêntica. Por outro lado foi impossível se determinar qualquer tipo de reação cruzada entre enterotoxina A e B. Outros estudos acerca da reatividade cruzada entre fragmentos de enterotoxina B e C1, obtidos por processos de tripsinização, mostraram que os fragmentos maiores das duas enterotoxinas, um de 17.000 daltons para enterotoxina B e 19.000 e 22.000 dalton para enterotoxina C1, reagiram com anticorpos homólogos para cada molécula íntegra da respectiva enterotoxina ainda que de forma menos eficiente do que para a toxina não digerida (107).

II.6.4 Estabilidade das enterotoxinas

As enterotoxinas no estado ativo são resistentes à ação de enzimas proteolíticas como a tripsina, quimiotripsina, renina e papaina (9), apresentando assim uma resistência à ação de proteases muito superior à maioria das proteínas. Estudos indicam que a enterotoxina B ativa é inativada por pepsina a pH 2,0 (8, 100), sendo que em valores mais elevados de pH não há alteração na atividade. Resultados semelhantes são obtidos com a enterotoxina C3. O fato de serem as enterotoxinas resistentes à ação de enzimas proteolíticas explica sua ação tóxica mesmo quando submetidas às condições do trato digestivo.

As enterotoxinas são consideradas termo resistentes, uma vez que não são completamente inativadas após fervura de extratos brutos por 30 minutos e administradas em macacos (30), observando-se uma redução na atividade da ordem de 50% quando a enterotoxina B é aquecida a 100o C por 5 minutos.

O valor Z para a enterotoxina B (52 - 58o F) é maior que para a enterotoxina A (46 - 50o F), indicando que a primeira apresenta uma resistência relativa maior que para enterotoxina A (90). Trabalhos realizados com as enterotoxinas B e C, mostram que tratamentos térmicos a 100o C inativam a ambas num período de 3 horas e que a taxa de

inativação era mais eficiente a 80o C do que a 100o C durante o período inicial de 10 a 30 minutos (43).

Com relação a valores de pH, estudos mostram que não há correlação homogênea entre as diversas enterotoxinas, assim enterotoxina A apresentou-se mais estável a pH menores, da ordem de 5,5 enquanto que para a enterotoxina D a inativação ocorria a pH de 6,5 (109).

Com relação à inativação das enterotoxinas por radiações, alguns dados indicam que doses de 5 Mrad são necessários para a redução de 90% na concentração de enterotoxina B em tampão veronal (91), necessitando-se de uma dose quatro vezes superior para o mesmo efeito em leite, obtendo-se o valor D em tampão e leite de 2,7 Mrad e 9,7 Mrad respectivamente.

II.6.5 Produção das enterotoxinas

Vários autores (60, 63, 94, 96) sugeriram diferentes métodos e meios de cultura para a produção de enterotoxinas estafilocócicas.

A utilização de meios derivados de hidrolisados proteícos são os recomendados (60, 94). Entre estes, citam-se o meio PHP (Protein Hydrolysate Powder) e o meio N-Z Amine NAK, isolados ou combinados em diversas concentrações e suplementados com tiamina e niacina (63, 118). Na realidade, os digeridos pancreáticos da caseína, tem sido utilizados para produção em larga escala de enterotoxinas, por serem compostos de peptídeos e outros fatores de crescimento de baixo peso molecular facilmente eliminados nas etapas de purificação de enterotoxinas (8, 108). Até há alguns anos atrás nosso laboratório utilizava o meio N-Z-Amine NAK (um digerido pancreático de caseína) (88), no entanto este meio deixou de ser produzido e passamos a utilizar outro contendo 4% de tripticase e 1% de extrato de levedura (73) tanto para fins de identificação de cepas quanto para purificação de enterotoxinas.

Investigações a respeito da cinética de formação de enterotoxina B revelaram que a toxina não foi detectada em meio de cultura antes do término da fase exponencial de crescimento (72, 82). A máxima produção ocorreu durante a

fase transiente entre crescimento exponencial e fase estacionária (82).

A enterotoxina B começa a ser detectada apenas após 5 horas de incubação a 37° C com a produção aumentando gradativamente até as 20 horas de incubação, enquanto que a cultura entra em fase estacionária de crescimento após 7 a 9 horas de incubação. Com diminuição da temperatura de incubação, há um decréscimo na quantidade de toxina sintetizada, sem que o crescimento seja afetado significativamente (72).

A adição de uma fonte de energia rapidamente metabolizável como glicose ou piruvato ao meio de caseína hidrolizada, causa severa repressão na síntese de enterotoxina B. A análise dos produtos finais do metabolismo da glicose e piruvato mostraram que, condições favoráveis à descarboxilação oxidativa do piruvato favorecem a repressão da síntese de toxina (79). Estudos feitos por muitos pesquisadores, (79, 80, 81, 82) levam a crer que a repressão da síntese de enterotoxina mediada pela glicose esteja sob controle catabólico (104), fato este que se apresenta em contradição com outros laboratórios revelando que a ação da glicose não está ligada a mecanismos de repressão catabólica, através de experimentos utilizando análogos da glicose. Assim, a ação de um metil glucosídeo apresentou um efeito estimulador enquanto que o 2-deoxiglicose inibiu

severamente a produção de enterotoxina. As células neste estudo eram permeáveis a 3'5' Adenosina Monofosfato (cAMP), porém a adição deste composto não reverteu a repressão da glucose ou do 2-deoxiglucose na síntese de enterotoxina B (104). Através destes estudos, os pesquisadores concluíram que a regulação da enterotoxina não estava sob controle catabólico, uma vez que em *E. coli* a adição de cAMP reverte a repressão da glucose na síntese de galactosidase.

A presença de glicose no meio resulta também em um abaixamento de pH, devido aos produtos de metabolismo da glucose. Estudos realizados com glucose incorporada ao meio de cultura, mostraram que teores menores de enterotoxina são produzidos na presença de glucose, em parte devido ao decrescimo de pH, uma vez que níveis mais elevados eram conseguidos em meios tamponados com pH superior a 5,6 (104).

O valor de pH ótimo para produção das enterotoxinas A, B e C ocorre na faixa entre 6,5 e 7,3 (61). Para a linhagem *S. aureus* 5-6 produtora de enterotoxinas A e B o valor limite encontrado em nosso laboratório para a produção de toxinas foi de 4,5 mesmo para culturas de 72 horas em meio NAK a 37o C, sendo que com valores de pH 5,0 após 24 horas foi possível se detectar 2,5 ug/mL (88).

Com relação às temperaturas de incubação, as mínimas e máximas indicadas para a produção de enterotoxina B foram 13 e 45o C, sendo que em alguns trabalhos realizados com presunto curado, após 2 semanas de incubação a 10o C em condições de anaerobiose e pH acima de 5,6 foi constatada a presença de enterotoxina B (45).

A adição de sais como cloreto de sódio, afeta grandemente a produção das enterotoxinas quer pelo efeito inibidor de seus íons, quer pela diminuição da atividade da água (aw) no meio de cultura. O abaixamento de aw de 0,99 a 0,98 ou 0,97 resulta em níveis muito baixos de produção de toxina, apesar de não comprometer de maneira apreciável o crescimento (114, 115).

Alguns estudos nos mostram que concentrações de 10% de NaCl tem pouca influência no crescimento de *S. aureus*, porém a níveis pouco superiores a 3%, o decréscimo na produção de toxinas é evidente (79).

A ação conjunta de NaCl, pH e temperatura é amplamente utilizada em estudos de inibição da síntese de enterotoxinas. Estes trabalhos revelaram ser o *S. aureus* capaz de crescer em caldos contendo 12% de NaCl a temperaturas entre 20 e 35o C. Nestas condições a produção de enterotoxina B é inibida, (113) todavia pode continuar se a concentração de NaCl for inferior a 4% (115).

Dados obtidos em nosso laboratório utilizando a linhagem S-6, mostraram que a redução na produção de enterotoxina B, em concentrações de 4% de NaCl e pH 6,0 após 72 horas de incubação, foi de 89,5% sendo que não se observou produção de enterotoxina A sob essas condições (88).

A adição de íons potássio (53,60 umoles/mL) e íons fluor (57,14 umoles/mL) reprimiram completamente a síntese de enterotoxinas. Entretanto a reversão da inibição por adição de íons magnésio, sugere uma dependência do sistema enzimático controlador da síntese de enterotoxinas (41). Quando íons magnésio na concentração de 0,4 a 1,5 mM, fosfatos de 1,44 a 2,87 mM e potássio de 1,5 a 30 mM, são introduzidos em meios de cultura previamente desmineralizados, observa-se um aumento de quase 100% na produção de enterotoxina B. A adição de outros íons metálicos não afeta de maneira significativa a síntese desta enterotoxina (110).

II.6.6 Purificação de enterotoxinas

Em 1965 alguns pesquisadores do Food Research Institute, EUA, descreveram um procedimento baseado em técnicas de extração em colunas cromatográficas, por meio das quais as enterotoxinas puderam ser purificadas (6,74). As etapas principais do processo de purificação podem ser descritas resumidamente como adsorção da toxina em resina de troca iônica Amberlite CG-50 e recromatografia em resina de carboxi metil celulose (100) seguidas de permeação em gel de Sephadex G-75 ou Sephacryl S-200 (119, 26). Mais recentemente muitos laboratórios vem empregando técnicas de focalização cromatográfica com a finalidade de se obter um rendimento maior e em um espaço de tempo menor. Após a filtração em gel são comuns as práticas de eletroforese em celulose, ou em gel de poliacrilamida com duodecilo sulfato de sódio (119) para a determinação da pureza das enterotoxinas.

II.6.7 Análise das enterotoxinas

O melhor método para diagnóstico de enterotoxinas sem dúvida é o ensaio biológico utilizando macaco rhesus (*Macaca mulatta*). Este teste é realizado administrando-se soluções de aproximadamente 50 mL de extratos livres de células da cultura sob investigação por via intragástrica. Estas soluções podem corresponder a extratos concentrados de até 20 vezes o volume inicial da cultura. Segundo recomendações do Food Research Institute é necessária a utilização de três grupos de seis animais cada (11).

As enterotoxinas estafilocócicas quando ministradas a animais de laboratório, em geral, induzem a uma resposta imune por parte do organismo receptor, com consequente formação de anticorpos específicos. Pela primeira vez, por volta de 1938, alguns pesquisadores reconheceram a antigenicidade das enterotoxinas (76). Posteriormente foi observada a reação de precipitação de antígeno e anticorpo em meio de ágar, identificando uma série de antígenos na preparação de enterotoxinas. A partir disso, começaram a ser utilizados métodos soriológicos para evidenciar enterotoxinas estafilocócicas e somente por volta de 1965 é que tais métodos foram inseridos à rotina laboratorial de análise de enterotoxinas (21).

O custo e manutenção dos animais, somado ao fato de que estes adquirem resistência às enterotoxinas são as maiores dificuldades encontradas pelos diferentes laboratórios que atualmente vem trabalhando na área de enterotoxinas estafilocócicas.

Entre as várias técnicas demonstrativas das reações de precipitação específica, as mais empregadas são: difusão em gel de ágar ou agarose (3, 16, 55), ou seja a imunodifusão dupla (5, 85), imunodifusão simples (86, 101) e a imunomicrodifusão em lâmina (22).

Estes métodos têm sido utilizados para caracterizar e quantificar as enterotoxinas estafilocócicas, a partir de extratos livres de células de cepas suspeitas.

Destes métodos, apenas o de microimunodifusão em lâmina tem sido utilizado para evidenciar a presença de toxinas, diretamente a partir de extratos, parcialmente purificados e concentrados, de alimentos sob investigação (22).

O limite de sensibilidade para o método de dupla difusão em gel situa-se ao redor de 0,5 ug/mL quando se utiliza o método modificado de Ouchterlony para "placas de ótica sensibilidade" (OSP) desenvolvido por pesquisadores do FRI (96). Para o micro método em lâmina, estes limites

extendem-se até 0,1 ug/mL (22). A técnica de difusão unidimensional foi, e ainda é, o método utilizado para análises quantitativas a partir de sobrenadantes e culturas, além de ser imprescindível para a quantificação de enterotoxinas nas diferentes fases de purificação, e determinação do título de soros imunes, apresentando sensibilidade de 1 a 2 ug/mL de enterotoxina.

Um dos principais problemas encontrados na determinação de enterotoxinas e de cepas toxigênicas responsáveis por intoxicação alimentar, está justamente relacionado à sensibilidade dos métodos propostos, uma vez que porcentagens significativas de cepas toxigênicas produzem concentrações ao redor de 1 ng/mL ou menos, estando portanto, abaixo dos níveis detectáveis pelos métodos supra citados (64), e ainda assim são capazes de provocar intoxicação alimentar (38). Há portanto, a necessidade da utilização de técnicas mais sensíveis, rápidas, e que possam ser aplicadas diretamente a extratos de alimentos (42).

Entre os métodos disponíveis atualmente, são citadas as técnicas de hemaglutinação passiva reversa, utilizando a adsorção de anticorpos específicos a hemáceas tratadas com ácido tânico, seguida de aglutinação de células sensibilizadas com enterotoxinas, apresentando uma sensibilidade ao redor de 0,1 ug/100 g de alimento. Um fator que deve ser considerado nesta metodologia é o surgimento de

reações inespecíficas de aglutinação (102). Em substituição às hemácias, outros métodos propõem a utilização de partículas de látex e tem apresentado resultados bastante precisos, da ordem de 0,1 ng/mL, quando utilizados para quantificação da toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) provocada por linhagens de *S. aureus* (58).

Um método rápido, eficiente e amplamente utilizado tanto em análises de alimentos quanto em pesquisas de enterotoxinas é o radioimunoensaio, (5, 112).

O princípio fundamental deste método baseia-se na competição entre enterotoxina marcada com ¹²⁵I e não marcada, pelo sítio de ligação de anticorpos que foram adsorvidos na parede interna de tubos de poliestireno. A sensibilidade deste método varia entre 1,0 a 5,0 ng/mL (62). O inconveniente do método é a necessidade de se manipularem substâncias radiativas, portanto acarretando riscos de contaminação aos técnicos e poluição ambiental, além de ser imprescindível infraestrutura e equipamentos sofisticados como os cintilógrafos que são de elevado custo técnico e operacional.

Com o intuito de se eliminar as desvantagens do radioimunoensaio, foi proposta a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) que utiliza uma fase sólida onde é adsorvida a imunoglobulina G (IgG), a seguir são adicionados

extratos de amostras supostamente contaminadas por enterotoxinas, e posteriormente após lavagem prévia do suporte é adicionada a IgG ligada a uma enzima (de preferência que produza compostos coloridos na reação com seu substrato) conhecida como conjugado. Decorrido um tempo predeterminado de incubação, a solução de conjugado é removida. Após esta etapa é adicionada uma solução de substrato, quando então ocorrerá a reação colorida que poderá ser observada a olho nú, no caso de simples diagnóstico da presença de toxina, ou medida espectrofotometricamente no caso de análises quantitativas, necessitando-se neste caso de uma curva padrão construída com valores conhecidos de enterotoxina (98, 42).

Alguns trabalhos realizados revelaram pelo menos quatro versões possíveis para a técnica de ELISA:

- a) método competitivo de ELISA com esferas de poliestireno:
- b) método de "sandwich" com anticorpos marcados:
- c) teste de inibição com anticorpos marcados e
- d) teste de inibição com anticorpos não-marcados.

Dentre estes o que apresentou melhores índices de reprodutibilidade foi o método de "sandwich" utilizando

esferas de poliestireno previamente adsorvidas de IgG. Através desse método foi possível se determinar concentrações da ordem de 0,1 ng de enterotoxina/mL (39).

As enzimas utilizadas no preparo do conjugado podem ser, peroxidase (42, 112), fosfatase (39) e B amilase (78), sendo que atualmente há uma tendência em vários laboratórios de se utilizar a fosfatase como a escolhida, uma vez que apresenta custo menor e não requer a utilização de substâncias tóxicas no preparo do conjugado.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. MATERIAIS

III.1.1. Organismos

Staphylococcus aureus 472-D (FRI)

Staphylococcus aureus 542 (FRI)

Staphylococcus aureus 396 (FRI)

Staphylococcus aureus 427 (FRI)

Staphylococcus aureus 464 (FRI)

III.1.2. Meios de Cultura

- Meio diferencial e seletivo: Baird-Parker (Difco),
adicionado de telurito de potássio e gema de ovo (BP).

- Meio para contagem de células viáveis: "Plate Count Agar",
(Difco) (PCA).

- Meio para produção de enterotoxinas: Triptona 3% e extrato
de levedura 1%, (Difco), (TEL).

- Meio de enriquecimento: Brain Heart Infusion (Difco), (BHI).

III.1.3. Reagentes para testes bioquímicos

- Reativos para coloração de Gram.
- Plasma liofilizado de coelho (Difco).

III.1.4. Reagentes para análise de enterotoxinas

- Enterotoxina estafilocócica tipo D (EED), fornecida pelo Dr. Merlin S. Bergdoll (Food Research Institute, FRI, Wisconsin, EUA).
- Soro anti-enterotoxina tip D, fornecido pelo Dr. Merlin S. Bergdoll (FRI).
- Agar Noble (Difco).
- Molde acrílico para O.S.P. modelo FRI, para dupla difusão em gel.
- Polietileno Glicol 6.000 (Sigma Chem. Co).

- Conjunto de reagentes para ensaio imunoenzimático de enterotoxinas estafilocócicas (Staphylococcae-Enterotoxin-ELISA-KIT). Labor Dr. W. Bommeli, Berna, Suíça).

- a) Frasco com 40 esferas de poliestireno revestidas de IgG anti-toxina D.
- b) Frasco com 40 esferas de poliestireno revestidas com IgG livre de anticorpos para enterotoxina estafilocócica.
- c) Frasco com 40 mL de conjugado enterotoxina D-enzima fosfatase.
- d) Frasco com 40 mL de soro normal de coelho.
- e) Frasco com 100 mL de solução de lavagem NaCl 0,14 M, Tween "20" 0,1%.
- f) Frasco com 10 pastilhas de 20 mg de p-Nitrofenilfosfato (pNPP).
- g) Frasco com 100 mL de tampão diluente Tris 0,01 M; NaCl 0,5 M; Tween "20" 0,1%, pH 7,5 e Azida sódica 0,1% (TNT).
- h) Tampão Fosfato Salino, 0,02 M, NaCl 0,85%, pH 7,4.

III.1.5. Equipamentos específicos

- Incubadores "Shaker" com controle de temperatura Modelo G-25 e G-24, New Brunswick, Scientific Ind. Co. Inc. New Jersey, USA.
- Espectrofotômetro U.V. Micronal Modelo B-382
- Pontenciômetro de pH, Corning Digital 110 de escala expandida em resolução de 0,01.
- Banhos termostáticos de temperatura controlada Fanem.
- Centrífuga refrigerada, Modelo IEC B-20A. International Equipment, USA.
- Liofilizador de bandeja, modelo LK-4 Edwards do Brasil.
- Câmaras de incubação modelo BOD Fanem.

III.1.6. Caracterização das culturas

Estas culturas recebidas foram ativadas em caldo de BHI a 37° C por 48 horas. A partir do caldo obtido,

inoculou-se por esgotamento placas com meio de Baird Parker (111).

Colônias típicas isoladas, pretas, brilhantes com halo de transparência e precipitação, foram caracterizadas pela reação de Gram e pelos testes bioquímicos de produção de coagulase (2) e produção da enzima desoxirribonuclease termo-resistente (5).

III.2. MÉTODOS

Foram utilizadas cinco linhagens cedidas pelo Dr. Merlin S. Bergdoll do FRI (Wisconsin, USA) denominadas por números como a seguir : *S. aureus* 542 isolada de queijo do tipo cheddar, *S. aureus* 396 isolada de salada de peixe cru, *S. aureus* 427 isolada de presunto cozido, *S. aureus* 464 isolada de fossa nasal de humano e *S. aureus* 472 D, linhagem reconhecida internacionalmente como típica produtora de enterotoxina tipo D.

Estas linhagens, com exceção da linhagem *S. aureus* 472, não apresentavam reações positivas aos ensaios sorológicos para diagnóstico de enterotoxina D, porém quando submetidas a ensaios biológicos em macacos, apresentavam resultados positivos com a administração intragástrica de aproximadamente 100 mL de sobrenadante de cultura. Estes dados, cedidos pelo laboratório de enterotoxinas estafilocócicas do FRI, caracterizaram estas linhagens como sendo baixo produtoras de EED.

III.2.1. Estudo do comportamento das linhagens

III.2.1.a. Preparo e padronização do inóculo

Frascos Erlenmeyer, previamente identificados com os números das diferentes linhagens e, contendo 50 mL de

melo composto de triptona 3% e extrato de levedura 1%, (TEL), foram inoculados com as respectivas culturas provenientes de melo BHI agar. Os frascos foram incubados sob agitação a 250 rpm, a 37o C durante 18 a 20 horas.

Após a incubação a densidade óptica das culturas foi acertada, utilizando-se volumes conhecidos de melo TEL, para um valor entre 0,4 e 0,5 em comprimento de onda de 600nm. A partir desta suspensão efetuaram-se diluições e registros das respectivas D.O.

O número de microrganismos das diferentes suspensões foi determinado pelo método de diluições e plaqueamento. Como diluente foi utilizado o próprio melo TEL e o plaqueamento em melo PCA.

Com os valores obtidos, para as diferentes linhagens, construíram-se curvas padrão correlacionando D.O. e número de microrganismos. Estas curvas foram utilizadas durante o decorrer dos experimentos subsequentes.

III.2.1.b. Culturas em frascos sob-agitação

Nesta etapa foram utilizados seis frascos de 1000 mL para cada linhagem, contendo 200 mL de melo TEL inoculados com 1 mL de cultura convenientemente diluída de forma a se obter um inóculo de $2,0 \times 10^5$ microrganismos. Os

frascos foram incubados sob agitação a 250 rpm, a 37o C durante 48 horas.

Foram retiradas amostras de 50 mL após 8, 12, 16, 20, 24 e 48 horas de incubação, nas quais foi determinado o número de microorganismos e a concentração de toxina produzida.

III.2.1.b.1. Preparo das amostras para a análise de enterotoxina

O crescimento das culturas foi medido através de leituras de D.O. após diluições adequadas e com o auxílio das respectivas curvas padrão (Figura 1). Para a análise de enterotoxinas foi utilizado o método imunoenzimático.

Ao fim de cada período estabelecido, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos a 4o C.

O sobrenadante foi dialisado contra água destilada a 4o C por 24 horas, com trocas de água a intervalos de 1 hora nas primeiras 5 horas.

Os dialisados foram a seguir concentrados com polietileno glicol 6000 até redução de 50% do volume original. O concentrado foi transferido para frascos de 50 mL e liofilizado em liofilizador de bandeja. Para a análise

de enterotoxina, o liofilizado foi ressuspensionado ao volume de 1 mL em tampão TNT, correspondendo a uma concentração de 50 vezes.

III.2.1.b.2. Análise quantitativa de enterotoxina D **Método do ensaio imunoenzimático** **(ELISA) (39)**

Para a realização dos ensaios, foi utilizado um conjunto de reagentes para análise de enterotoxinas (Staphylococcal Enterotoxin Set-EIA, Toxin Technology, USA), cedido por Dr. M.S. Bergdoll (FRI). Este conjunto utiliza o método de "sandwich", sendo o conjugado preparado com a enzima fosfatase.

III.2.1.b.2.a. Confeccção da curva padrão

Enterotoxina D parcialmente purificada e liofilizada foi diluída na concentração de 50 ug/mL utilizando-se tampão TNT e 0,1% de azida sódica, de acordo com as especificações dos fornecedores (Toxin Technology) e armazenada a -20o C.

Para a construção da curva padrão, a solução estoque foi diluída no mesmo tampão obtendo-se concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 8,0 e 10,0 ng/mL.

Uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi tratada com 50 uL de soro normal de coelho, (com a finalidade de se evitar interferências da proteína A de estafilococos que pode se ligar de forma inespecífica a imunoglobulina G), durante 30 minutos. As amostras tratadas foram colocadas em triplicata em tubos de ensaio (16 x 160 mm), procedendo-se ao ensaio imunoenzimático seguindo as recomendações do fornecedor como se segue:

1o. Adicionou-se uma esfera de poliestireno revestida de imunoglobulina G específica para enterotoxina D a cada tubo. Estes foram mantidos em incubador sob agitação de 50 rpm, por 12 horas à temperatura ambiente.

2o. A solução foi a seguir removida por sucção e as esferas lavadas duas vezes com solução de lavagem sendo posteriormente transferidas para tubos de poliestireno.

3o. Aos tubos contendo as esferas, foi adicionado 0,5 mL da solução conjugado EED - fosfatase e incubados por 6 horas sem agitação.

4o. As esferas foram lavadas três vezes, completando-se o volume dos tubos com solução de NaCl 0,14 M e Tween 20 0,1% e removendo-se o líquido com o auxílio de vácuo.

50. Na etapa seguinte foi adicionado 1 mL da solução de p-nitrofenilfosfato (substrato) na concentração de 1,5 mg/mL aos tubos que foram incubados por 60 minutos à temperatura ambiente. Findo este tempo, a reação foi bloqueada pela adição de 100 uL de solução NaOH, 2N a cada tubo.

A absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 405 nm. As leituras foram sempre realizadas contra um controle "branco" que correspondia a uma solução proveniente da reação entre qualquer diluição de EED e uma esfera revestida com IgG obtida de soro sanguíneo de coelho não imunizado, ou soro normal.

Desta forma construiu-se uma curva padrão utilizada nas leituras das diferentes soluções a serem analisadas. A cada novo lote de reagentes procedeu-se à construção de nova curva.

III.2.1.b.2.b. Análise das amostras

Na análise das amostras, foram substituídas as soluções antígeno de concentração conhecida por igual volume a ser testado, seguindo-se o procedimento anteriormente mencionado.

Após a leitura das D.O. a concentração de enterotoxina foi obtida diretamente, entrando-se com estes valores na curva padrão (Figura 3).

III.2.1.c. Culturas obtidas pelo método de crescimento utilizando-se sacos de diálise (96)

Um volume de 70 mL de meio TEL foi acondicionado em tubo de membrana de diálise previamente fechado em uma das extremidades. Após a adição do meio, o tubo foi fechado e introduzido em Erlenmeyer de 300 mL, contendo 19,0 mL de tampão PBS. Os conjuntos, no total de seis para cada linhagem, foram fechados com tampão de algodão e levados a esterilização em autoclave de forma convencional.

Após a esterilização, o meio foi resfriado à temperatura ambiente e inoculado com 1,0 mL de cultura padronizada, de forma a se obter um inóculo de 2×10^4 microrganismos. Os frascos foram incubados sob agitação a 250 rpm, a 37°C durante 48 horas.

III.2.1.c.1. Preparo das amostras para a análise de enterotoxinas

Foram tomadas amostras de aproximadamente 10 mL após 8, 12, 16, 20, 24 e 48 horas de incubação para a

análise de enterotoxina pelos métodos de dupla difusão em gel e ensaio imunoenzimático.

As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos e 4o C. O ensaio imunoenzimático foi realizado diretamente do sobrenadante em um volume de 1,0 mL de acordo com o item III.2.1.b.2.b. Para a análise por imunodifusão, as amostras foram preparadas como descrito no item III.2.1.b.1. O volume de tampão TNT utilizado foi de 1,0 mL, correspondendo a uma concentração de 10 vezes o volume original.

III.2.1.c.2. Análise semi-quantitativa - Método de "Placas de Sensibilidade ótima (O.S.P.) - Modificação do método de Ouchterlony (85,96)

O método de dupla difusão em gel, foi utilizado para determinação semi-quantitativa das enterotoxinas. Este procedimento utiliza placas de "Petri" de 50 mm de diâmetro, recobertas com 4,0 mL de agar Noble 1,2%, preparado com tampão PBS e filtrado a quente através de papel Whatman no. 2, com auxílio de vácuo.

Após a solidificação o agar foi perfurado utilizando-se um molde acrílico padronizado.

Ao orifício central foi adicionado antissoro D na diluição 1:10, nos orifícios laterais menores, foi adicionado antígeno padrão, EED na concentração de 4 ug/mL e nos orifícios laterais maiores foram adicionados os extratos obtidos nas linhagens a serem testadas.

As placas assim preparadas foram incubadas em câmara úmida a 37o C por 24 horas. A câmara úmida foi obtida, recobrimo-se uma placa de Petri de 250 x 25 mm com algodão ou papel de filtro umidificado com água destilada.

Após o período de incubação as placas foram observadas sobre um fundo opaco com luz indireta e difusa, podendo-se utilizar uma lupa para facilitar a visualização das linhas de precipitação. Também foi utilizada solução de ácido fosfórico 0,1 M para recobrir a placa quando a visualização das linhas não era nítica.

III.2.2. Estudo do comportamento das linhagens em alimentos

Foram utilizados, creme de composição idêntica àquela utilizada em rechelos de doces de confeitaria, preparado no laboratório, e presunto cozido adquirido em supermercados da região. Estes alimentos foram escolhidos por estarem frequentemente relacionados a surtos de

intoxicação alimentar estafilocócica e amplamente consumidos.

III.2.2.a. Estudo do comportamento das linhagens em creme de confeitaria

III.2.2.a.1. Preparo do creme

O creme foi preparado utilizando-se o mesmo método e ingredientes empregados em estabelecimentos comerciais, nas seguintes quantidades: 400 g de açúcar refinado, 100 g de amido de milho (maizena), 8 mL de solução de corante amarelo para alimentos (Tintanol) 1%, uma gema de ovo e dois litros de leite tipo C.

Os ingredientes foram homogeneizados e aquecidos sob agitação até a obtenção de um creme com consistência adequada ao uso de confeitaria. Este creme foi dividido em dois lotes iguais e cada um distribuído em frascos Becker de 100 mL em porções de 50 g. Os frascos foram fechados com folha dupla de papel de alumínio. Um dos lotes foi levado à esterilização em autoclave a 121o C por 15 minutos e o outro utilizado diretamente.

III.2.2.a.2. Inoculação do creme

Para cada linhagem em estudo foram utilizados 12 frascos contendo creme, sendo metade inoculada com cultura padronizada, de forma a se obter uma concentração de 10^3 microrganismos/g e a outra metade com concentração de 10^4 microrganismos/g. Dois frascos contendo creme, um previamente esterilizado e outro não, foram utilizados como controle e mantidos a uma temperatura de 37o C.

Os frascos inoculados foram homogeneizados e incubados às temperaturas de 25, 30 e 37o C.

III.2.2.a.3. Contagem da flora mesófila e Staphylococcus aureus nas amostras de creme(2)

Foram retiradas amostras de 10 g de creme após 24 e 48 horas nas diferentes temperaturas. A contagem do número de microrganismos mesófilos foi feita pelo método padrão em placas com meio PCA e os estafilococos pelo método de superfície utilizando-se o meio seletivo e diferencial de Baird-Paker.

Para as amostras dos cremes previamente esterilizados todas as contagens foram realizadas em meio PCA.

III.2.2.a.4. Determinação de enterotoxina estafilocócica tipo D em creme

Amostras de 50 g de creme foram homogeneizadas com igual volume de tampão TNT a pH 7,5 em liquidificador por 2 minutos. Esta mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 40 C.

Para a análise de enterotoxina pelo método ELISA, foi necessária a construção de uma curva padrão idêntica à já anteriormente descrita no item III.2.1.b.2.a., sendo que o tampão diluente foi substituído pelo sobrenadante proveniente de um creme não contaminado utilizado como controle.

III.2.2.b. Estudo do comportamento das linhagens em presunto cozido

III.2.2.b.1. Preparo do presunto

O presunto cozido adquirido em peças inteiras em supermercado da região foi fatiado e distribuído em quantidades de 50 g em 12 placas de Petri com diâmetro de 150 mm. As placas foram divididas em dois lotes, um deles foi esterilizado em autoclave a 121o C por 15 minutos e o outro utilizado diretamente.

III.2.2.b.2. Inoculação do presunto

As placas contendo o presunto foram inoculadas de forma idêntica à utilizada em creme como descrito no item III.2.2.a.2.

III.2.2.b.3. Contagem da flora mesófila e de Staphylococcus aureus nas amostras de presunto(2)

A determinação do número de células em presunto foi realizada conforme descrito para creme, de acordo com o item III.2.2.a.3.

III.2.2.b.4. Determinação de enterotoxina estafilocócica em presunto

O procedimento utilizado nas amostras de 50 g de presunto foi o mesmo descrito no item III.2.2.a.4., sendo também neste caso necessário a construção de uma curva padrão utilizando como diluente das soluções conhecidas de antígeno, o sobrenadante proveniente de amostras de presunto não contaminado, utilizado como controle.

IV. RESULTADOS

IV.1. Caracterização das culturas de *S. aureus*

Os testes bioquímicos realizados conforme descritos na secção anterior, confirmaram a pureza e as características das culturas em estudo.

IV.2. Culturas em frascos sob agitação

Os resultados obtidos na Tabela 02, referentes à análise pelo método imunoenzimático dos sobrenadantes concentrados de todas as culturas, com exceção da linhagem 472, nos mostram que às 8 horas de incubação, apenas as linhagens 472, 396 e 427 haviam produzido enterotoxina nos valores de 29,3; 7,0 e 10,0 ng/mL, respectivamente.

O crescimento microbiano apresentou contagens da ordem de 10^6 células/mL para todas as culturas no período acima mencionado conforme a Tabela 01. Após 12 horas de incubação, a linhagem 464 atingiu $4,3 \times 10^7$ microrganismos/mL e o teor de toxina detectado foi de 6,0 ng/mL (Tabela 02, Figura 04). Somente após 16 horas de incubação a linhagem 542 produziu enterotoxina na concentração de 5,8 ng/mL, quando a população atingiu ao redor de 10^8 microrganismos/mL.

As culturas a partir das 16 horas de incubação estavam praticamente no final da fase de crescimento exponencial, com variações de no máximo 1,5 ciclo logarítmico no número de células nas 32 horas subsequentes, como pode ser observado na Tabela 01 e Figura 02.

A taxa de produção de toxina, foi máxima para todas as linhagens no período entre 16 a 20 horas de incubação, como mostra a Tabela 03, variando entre 52,07 e 1,82 ng/mL/h para as linhagens 472 e 542 respectivamente. Durante todo o experimento a linhagem padrão produziu aproximadamente 4 vezes mais toxina do que as outras linhagens.

IV.3. Culturas obtidas pelo método de crescimento utilizando-se saco de diálise

As amostras de sobrenadante das culturas foram analisadas pelo método imunoenzimático e de dupla difusão em gel. Dos dados obtidos da Tabela 05, podemos observar que apenas a linhagem padrão apresentou resultados positivos ao teste de precipitação em gel, após 8 horas de incubação utilizando-se diretamente o sobrenadante da cultura (Tabela 07).

Os extratos concentrados, referentes às culturas das linhagens 396 e 427, produziram bandas de precipitação nas

placas de O.S.P. após 20 horas de incubação. Estas bandas, embora tênues e difusas, aumentaram de intensidade nas amostragens subsequentes, porém com nitidez inferior àquela apresentada com as soluções de antígeno padrão, mostrando que a concentração de toxina produzida por ambas foi inferior a 2 ug/mL.

Pela técnica mencionada, não foi possível se detectar a presença de toxina nas amostras das culturas 464 e 542. Apenas com o sobrenadante da cultura da linhagem 472 se visualizou uma linha definida, simétrica e de continuidade com aquela apresentada pela solução padrão de antígeno nas placas de O.S.P. Após 48 horas de incubação da cultura, a banda de precipitação aumentou de intensidade e se aproximou das bordas do orifício central da placa, onde se encontrava o respectivo antissoro, mostrando que a concentração de toxina difundida foi maior que a contida no orifício do padrão.

Quando se utilizou o método imunoenzimático para a análise quantitativa de enterotoxina (Tabelas 04 e 05, Figura 05), observamos na primeira amostragem que as linhagens 472, 427 e 396 produziram 210,0; 92,5 e 67,8 ng/mL de toxina respectivamente e após 12 horas de incubação os sobrenadantes das culturas 427 e 464 apresentaram concentrações de 153,8 e 64,2 ng/mL de toxina.

Ao término deste experimento, a quantidade de toxina produzida pela linhagem padrão foi superior às demais linhagens variando entre 5 e 33 vezes aquelas produzidas pelas demais linhagens.

A taxa de produção de toxina apresentou o valor máximo no intervalo entre 16 a 20 horas de incubação como se observa na Tabela 06, variando de 5,97 a 282,5 ng/mL/h para as linhagens 542 e 472 respectivamente e um mínimo de aproximadamente 1,5 ng/mL/h para todas as culturas.

IV.4. Produção de enterotoxina estafilocócica D em cremes de confeitaria

Conforme detalhado na secção anterior realizou-se um estudo comparativo entre creme esterilizado e não esterilizado inoculado com suspensões conhecidas das linhagens em estudo sob temperaturas de 25, 30 e 37o C após 24 e 48 horas.

Na Tabela 08 encontram-se os valores obtidos com creme inoculado à concentração de 10^3 microrganismos/g de produto. As amostras não esterilizadas apresentavam às 24 horas de incubação contagens médias do número de microrganismos mesófilos da ordem de $4,0 \times 10^7$ para as temperaturas 25 e 30o C e de $1,0 \times 10^8$ para 37o C. Em creme esterilizado, observam-se grandezas de 10^6 , 10^7 e 10^8 para

as contagens de estafilococos a 25, 30 e 37o C respectivamente.

Não se detectou a presença de enterotoxina em nenhuma amostra de creme incubado a 25o C, com exceção ao creme esterilizado inoculado com a linhagem 472, onde se detectou 3,5 ng de toxina por grama de creme. A 30o C observou-se a produção de toxina nos cremes inoculados com as linhagens 396, 542 e 472 com valores de 1,5; 1,6 e 5,2 ng/g respectivamente. Em creme esterilizado todas as amostras apresentaram quantidades médias de toxina ao redor de 3,0 ng/g para as linhagens baixo produtoras e 10,6 ng/g para a linhagem padrão. Nos cremes incubados a 37o C todas as linhagens produziram toxina, em concentrações de 15 ng/g para a linhagem 472 e em média 2 ng/g para as demais.

Conforme pode-se observar nos valores da Tabela 08, após 48 horas de incubação, as contagens tanto do número de microrganismos mesófilos como de *S. aureus* apresentaram um aumento aproximado de 1 ciclo logarítmico para o creme não esterilizado e de 2 ciclos para o número de estafilococos nas amostras previamente esterilizadas. Este mesmo comportamento ocorreu a 30 e 37o C.

A produção de enterotoxina ocorreu nas amostras incubadas a 25o C com as linhagens 472 e 396, apresentando valores de 5,2 e 1,2 ng/g respectivamente em creme não

esterilizado. Na amostra esterilizada todas as linhagens foram capazes de produzir enterotoxina nas concentrações de 3,0 ng/g para as linhagens 396 e 427, 2,5 ng/g para 464 e 542 e 7,6 ng/g para a linhagem padrão. A 300 C em creme não esterilizado apenas a linhagem 427 não apresentou níveis detectáveis para enterotoxina, as demais baixo produtoras, apresentaram níveis médios de 2,5 ng/g e a linhagem padrão 12,4 ng/g. Em creme esterilizado observou-se um aumento na produção de toxina com valor de 16,2 ng/g para a linhagem 472 e ao redor de 5 ng/g para as outras linhagens.

A produção de toxina a 370 C, seguiu o mesmo comportamento observado no experimento a 300 C, atingindo valores de 18,5 e 30 ng/g para a linhagem padrão nos cremes não esterilizado e esterilizado respectivamente, sendo os menores valores observados com a linhagem 464, que produziu 2,1 e 5,2 ng/g em cremes não esterilizado e esterilizado, seguido das linhagens 427 e 542 que finalizaram o experimento com 7,0 ng/g no creme esterilizado e 5,5 ng/g no creme não esterilizado.

A Tabela 09 apresenta os valores obtidos em cremes inoculados com suspensões das linhagens de *S. aureus* de forma a se obter uma concentração inicial de 10⁴ células/g. Como se pode observar, o padrão de comportamento foi similar ao anteriormente descrito, tanto no que diz respeito à concentração celular de microrganismos por grama

de creme, quanto à concentração de toxina. Os valores finais apresentaram-se ligeiramente acima daqueles previamente descritos.

IV.5. Produção de enterotoxina estafilocócica D em presunto cozido

De modo geral o comportamento das linhagens não diferiu significativamente daquele observado nos experimentos com creme. Os valores encontrados na Tabela 10, referentes a presunto inoculado com concentrações de 10^3 células de *S. aureus*/g, mostram que as contagens de microrganismos mesófilos após as primeiras 24 horas de incubação foram de: $5,0 \times 10^8$ microrganismos/g à 25o C, $1,0 \times 10^9$ a 30o C e $4,3 \times 10^9$ a 37o C. Em presunto previamente esterilizado os valores para contagens de *S. aureus* foram de $1,2 \times 10^5$ células/g a 25o C, $1,0 \times 10^6$ a 30o C e $3,0 \times 10^6$ a 37o C.

Em presunto não esterilizado e mantido a 25o C não foi possível se detectar enterotoxina, apenas nas amostras esterilizadas foram determinadas 1,6 ng/g de toxina com a linhagem 427 e 8,1 ng/g com a linhagem padrão. A 30o C apenas as linhagens 396 e 472 produziram 1,8 ng/g e 6,3 ng/g respectivamente em presunto não esterilizado. Em presunto esterilizado todas as linhagens produziram toxina com valor médio de 4,3 ng/g para as linhagens baixo produtoras e 17,6 ng/g para linhagem 472.

Em presunto mantido a 37o C foi possível se detectar 20,2 ng/g de toxina para a linhagem padrão e as demais situaram-se ao redor de 3,6 ng/g.

Conforme se observa na Tabela 10, após 48 horas de incubação, as contagens tanto do número de células de *S. aureus* como de mesófilos em geral apresentaram um aumento inferior a 1 ciclo logarítmico em presunto não tratado termicamente e de aproximadamente 2 ciclos em presunto esterilizado. Comportamento similar foi encontrado tanto nas amostras mantidas a 30o C quanto a 37o C para os dois tipos de presunto.

Após 48 horas de incubação, a produção de enterotoxina em presunto não esterilizado e nas amostras mantidas a 25o C, ocorreu apenas com as linhagens 427 e 472 em quantidades de 2,4 e 6,5 ng/g respectivamente. Nas amostras esterilizadas, as linhagens 464 e 542 não produziram enterotoxina e os valores determinados para as outras foram: 2,6 ng/g para a linhagem 396; 3,2 ng/g para a 427 e 10,1 ng/g para a linhagem padrão. A 30o C em presunto não esterilizado, apenas a linhagem 542 não apresentou níveis detectáveis de enterotoxina, as outras apresentaram níveis médios ao redor de 3 ng/g e a linhagem padrão 12,5 ng/g. Em presunto esterilizado observou-se um aumento na produção de toxina com valores de 26,5 ng/g para a linhagem

472, ao redor de 8,0 ng/g para a 396 e 464 e de aproximadamente 5 ng/g para as demais.

A 370 C, todas as linhagens produziram enterotoxina nos dois tipos de presunto, atingindo valores de 32,6 e 46,0 ng/g para a cultura padrão nas amostras não esterilizada e esterilizada respectivamente. Os menores valores foram obtidos para a linhagem 464, com concentrações de 3,7 e 8,4 ng/g em presunto não esterilizado e esterilizado e 542 que produziu 4,4 ng/g em presunto não esterilizado e 8,2 ng/g em presunto esterilizado.

A Tabela 11 mostra os valores obtidos a partir de amostras de presunto inoculado com um teor de ⁴10 células de *S. aureus*/g. Da mesma forma como ocorreu em creme, os resultados foram similares aos obtidos com um inóculo 10X mais concentrado.

V. DISCUSSÃO

A produção de extratos contendo concentrações elevadas de toxinas a partir das linhagens de *S. aureus* em estudo, foi uma das metas na caracterização de linhagens conhecidas como baixo produtoras de enterotoxina (10,11). Por outro lado a utilização de metodologias mais sensíveis para a identificação e quantificação da toxina produzida foi também um dos objetivos deste estudo.

As linhagens utilizadas neste trabalho não apresentam respostas positivas às análises convencionais de enterotoxina sugeridas por muitos autores (02). Por outro lado o histórico que acompanhava estas culturas fornecidas pelo Dr. Merlin S. Bergdoll, mostrava que as linhagens 396 e 427 provocaram emese em 4 e 3 animais, respectivamente, em um conjunto de seis macacos (*macacos rhesus*), quando se administraram 50 mL de sobrenadante filtrado. A linhagem 464 apresentou reação positiva em todos os seis animais após a ingestão de 100 mL de sobrenadante concentrado, equivalente a 1000 mL e a linhagem 542 provocou reação emética em 4 animais com volume de 100 mL de extrato equivalente a 300 mL de cultura.

O comportamento destas linhagens foi estudado utilizando-se os métodos de crescimento com saco de diálise e em frascos sob agitação.

Os resultados obtidos pelo método de saco de diálise mostraram um rendimento superior a 9 vezes aquele obtido em frascos, como se observa na Tabela 07, valores estes que apresentam similaridades com outros autores (01). Esta metodologia no entanto não permitiu a determinação da concentração celular de forma precisa, uma vez que as membranas de diálise tornam-se impregnadas de células, impedindo uma perfeita homogeneização da suspensão a ser analisada.

O motivo pelo qual realizou-se o experimento de culturas crescidas em frascos sob agitação, foi para se obter dados a respeito da concentração mínima de células necessárias para a detecção de toxina, como pode ser visto nas Tabelas 01 e 02.

Os dados por nós obtidos estão em conformidade com os encontrados em outros trabalhos (01, 83), utilizando linhagens normalmente produtoras de enterotoxinas. Depreende-se desse fato que mesmo para as linhagens conhecidas como baixo produtoras de toxina, a população celular mínima situou-se próximo a 10^6 células de *S. aureus*/mL de sobrenadante de cultura (Tabela 01 e 02). Comportamento similar foi observado nos estudos em alimentos como evidenciam as Tabelas 08, 09, 10 e 11.

A quantificação das enterotoxinas foi realizada em todos os experimentos pela técnica do ensaio imunoenzimático. A menor concentração detectada pelo método foi praticamente 1 ng/g de creme, como pode ser observado na Tabela 08. A sensibilidade do método de ELISA segundo vários pesquisadores situa-se ao redor de 1 ng/g (78, 42, 112) no entanto este valor é contestado por alguns outros que sugerem como limites de sensibilidade teores abaixo de 1 ng/mL (84, 38, 64). Estas diferenças em geral são devidas basicamente a interferências com a proteína A de *Staphylococcus* que frequentemente dá resultados falso positivos. O alto índice de reprodutibilidade observado, tanto com relação às diversas repetições realizadas nas amostras como as referentes às curvas padrão utilizando concentrações abaixo da 5 ng/g (Figura 03), mostraram ser o método ELISA o mais indicado para se detectar baixas quantidades de toxina.

De acordo com a Tabela 05, pode-se verificar que, a quantidade de toxina requerida em sobrenadantes de cultura para produzir bandas de precipitação em ensaios de imunodifusão dupla foi de aproximadamente 0,3 ug, ou seja um valor 300 vezes superior ao limite de sensibilidade do método de ELISA. Ainda pela Tabela 05 pode-se observar que as linhagens 464 e 542, seriam consideradas não produtoras de enterotoxina pela metodologia convencional e estas mesmas linhagens estariam produzindo toxina nas concentrações de

370 e 115 ng/mL. Estas quantidades são suficientes para provocarem episódios de intoxicação alimentar, segundo o estudo de um surto ocorrido nos EUA, envolvendo uma população restrita e de onde os autores estimaram as concentrações eméticas da ordem de 0,5 a 1 ng/ml (38).

Um inconveniente notado no método de O.S.P., é a observação das linhas de precipitação, quando são analisadas concentrações próximas ao limite de sensibilidade. A visualização se torna difícil e depende em muito da prática e frequência com que são realizados estes ensaios, estando sujeita a interpretação dos resultados subjetivos do analista.

Produtos de confeitaria, segundo a literatura (21, 38, 44), são frequentemente responsabilizados por surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, bem como produtos cárneos embutidos. Devido ao elevado consumo no Brasil destes tipos de alimentos os mesmos foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho. Os resultados obtidos nas diferentes condições de incubação e amostragem, revelaram elevados índices de contagem da flora mesófila que competiu e antagonizou o efeito do crescimento de *S. aureus*. Esta flora mesófila em creme foi basicamente composta por formas bacilares esporuladas, já que a temperatura de cocção e preparo do creme atingia valores de 90o C por alguns minutos. Embora não se tenham feito determinações da

composição desta flora, frequentemente encontraram-se colônias de bastonetes gram positivos e esporulados com crescimento espalhado em placas de meio PDA características do gênero *Bacillus* (105).

A produção de enterotoxina nos dois tipos de produtos, foi praticamente idêntica após 48 horas de incubação. Conforme mostram as Tabelas 08, 09, 10 e 11, de onde se conclui, serem os embutidos veículos em potencial conjuntamente com produtos de confitaria, para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Este fato também foi relatado por estudos feitos com carne exportada do Brasil para a Inglaterra em 1983, mostrando a incidência de enterotoxina estafilocócica em carnes (71).

As linhagens em estudo quando comparadas à linhagem padrão produziram quantidades inferiores que variavam de 1/3 a 1/9. Estes valores estão de acordo com os encontrados em literatura (64), muito embora as temperaturas de incubação utilizadas neste estudo sejam elevadas acima das temperaturas convencionais de refrigeração é prática comum em muitos estabelecimentos comerciais a manutenção desses alimentos, principalmente doces recheados com cremes, bolos confeitados e etc. em condições de refrigeração inadequada e frequentemente até expostos a temperatura ambiente, que em nosso país atinge níveis de até 40o C no período de verão. Situações semelhantes ocorrem com a

comercialização e distribuição de lanches por vendedores ambulantes em logradouros públicos, bares e lanchonetes.

VI. Conclusões

Segundo os resultados obtidos neste estudo, e de acordo com os comentários feitos nas secções anteriores, podemos resumir tais observações nos itens abaixo discriminados :

1. Das linhagens em estudo, apenas a 472 pode ser caracterizada como produtora de enterotoxina D pelos métodos convencionais de imunodifusão em gel.
2. Entre os métodos de cultivo empregados, a técnica que utiliza saco de diálise apresentou resultados muito superiores ao método de cultivo em frascos, com produção de toxina aumentada em cerca de 10 vezes.
3. Os intervalos de máxima produção de enterotoxina para as linhagens baixo produtoras, situou-se entre 16 e 20 horas de incubação nos dois métodos empregados.
4. Houve concordância com outros autores quanto ao valor de 10^6 células para o início da produção de enterotoxina em níveis detectáveis.
5. A linhagem padrão 472 produziu até 33 vezes mais toxina que a linhagem baixo produtora 542.

6. Mesmo a 25° C observou-se produção de toxina, tanto em meios de cultura como em alimentos.
7. Um aumento de 10 vezes no inóculo inicial não teve influência significativa na produção de enterotoxina após 48 horas de incubação.
8. Os níveis mais baixos de enterotoxina D encontrados em creme e presunto não esterilizados, quando inoculados com linhagens baixo produtoras, foram de 1,2 e 2,4 ng/g, respectivamente, concentrações essas suficientes para provocarem intoxicação alimentar em indivíduos saudáveis.

VII. Referências Bibliográficas *

1. Adesiyun, A.A.; Tatini, S.R. & Hoover, D.G. - Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. Vet. Microbiol., 9: 487-495, 1984.
2. Baer, F.E.; Gray, R.J.H. & Orth, D.S. - Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: Speck, M.L., ed. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. New York, Academic Press, 1981. p. 374-384.
3. Barry, A.J.; Lachica, R.V.F. & Atchinson, F.W. - Identification of *S. aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. Appl. Microbiol. 25: 496-497, 1973.
4. Beckers, H.S.; Van Leusden, F.M. & Tips, P.D. - Growth and enteropin production of *S. aureus* in shrimp. J. Hyg. (Lond), 95: 685-693, 1985.

* A listagem das referências bibliográficas, seguiram a normalização utilizada na publicação - "Referências bibliográficas em ciências biomédicas", publicação da Associação Paulista de Bibliotecários. U.S.P., São Paulo, 1971.

5. Bennett, R.W. - Microbiological methods. J. ADAC, 54: 1037-1038, 1971.
6. Bergdoll, M.S. - Chemistry and detection of Staphylococcal enterotoxins. Proc. 14th, Re. Conf. Am. Meat Inst. Found., Circ., 70: 47, 1962.
7. Bergdoll, M.S. - Immunization of Rhesus monkeys with enterotoxoid B. J. Inf. Diseases., 116: 191-196, 1966.
8. Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In: Thomas, C.M., ed. Microbial Toxins. New York, Academic Press, 1970. Vol. III. p. 265-327.
9. Bergdoll, M.S. - The enterotoxins. In: Cohen, J.O., ed. The Staphylococci. Toronto, Wiley - Interscience, 1972. p. 301-331.
10. Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In: C.F.S. Easman and C. Adlam (ed)., Staphylococci and Staphylococcal infections, vol. 2, Academic Press, Inc. (London), Ltd. London; 1963. p. 559-598.
11. Bergdoll, M.S. - Monkey feeding test for Staphylococcal enterotoxin. In: Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1968. Vol. 165. p. 324-333.

12. Bergdoll, M.S.; Borja, C.R. & Avena, R.M. - Identification of a new enterotoxin as enterotoxin G. J. Bacteriol., 90: 1481-1485, 1965a.
13. Bergdoll, M.S.; Borja, C.R.; Robbins, R.N. & Weiss, K.F. - Identification of Enterotoxin E. Infect. Immunity, 4, no 5: 593-595, 1971.
14. Bergdoll, M.S.; Cross, B.A.; Reiser, R.F.; Robbins, R.N. & Davis, J.P. - A new Staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome. Staphylococcus aureus isolates. Lancet, 1: 1017-1021, 1981.
15. Bergdoll, M.S. & Reiser, R. - Application of radio-immunoassay for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. J. of Food Prot., 43: 68-72, 1980.
16. Bergdoll, M.S.; Sargaela, M.J. & Deck, G.M. - Staphylococcal enterotoxin. J. Immunol., 83: 334-338, 1959b.
17. Bergdoll, M.S.; Weiss, K.F. & Muster, M.J. - The production of Staphylococcal Enterotoxin by Coagulase Negative Microorganisms. Bact. Proc., 12, 1967.

18. Berry, J.T.; Taylor, S.L.; Freed, R.C. and Bergdoll, M.S. - Effects of Staphylococcal Enterotoxin A on the rat gastrointestinal Tract. Infect. Immunity, 44: 234-240, 1984.
19. Casman, E.P. - Further Serological Studies of Staphylococcal Enterotoxin. J. Bacteriol., 7:849-856, 1960.
20. Casman, E.P. - The microslide gel double diffusion test for the detection and assay of Staphylococcal enterotoxins. Health Lab. Science, 6: 185-197, 1979.
21. Casman, E.P. & Bennet, R.W. - Detection of Staphylococcal enterotoxins in food. Appl. Microbiol., 13: 181-189, 1965.
22. Casman, E.P.; Bennett, R.W.; Dorsey, A.E. & Stone, J.E. - The microslide gel double diffusion test for the detection and assay of Staphylococcal enterotoxins. Health Lab. Science, 6: 185-197, 1969.
23. Casman, E.P.; Bennett, A.E. & Issa, J.A. Identification of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. J. Bacteriol., 94: 1875-1882, 1967.

24. Casman, E.P.; Bergdoll, M.S. & Robinson, J. -
Designation of Staphylococcal enterotoxins. J.
Bacteriol., 85: 715-716, 1963.
25. Centorbi, O.N.D.; Cuadrado, A.M.A.; Carrizo, S.C.C.; de
Milan, M.C.C.; Gimenez, D.F. & Bergdoll, M.S. -
Prevalence and characterization of Staphylococcus
aureus in young goats. Am. J. Vet. Res., 49: 1494-
1496, 1988.
26. Chang, H.C. & Bergdoll, M.S. - Purification and some
physicochemical properties of Staphylococcal Enterotoxin
D. Biochem., 18: 1937-1942, 1979.
27. Crawley, G.J. apud Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In:
C.F.S. Easman and C. Adlam. ed., Staphylococci and
Staphylococcal Infections, vol. 2, London, Academic
Press, 1983. p. 559-598.
28. Danielsson, M.L. & Hellberg, B. - Prevalence of
enterotoxigenic Staphylococci in nose, throat and skin
lesions in meat-workers. Acta Vet. Scand., 25: 242-249,
1984.

29. Davis, B.D.; Dulbeco, R.; Eisen, H.M.; Ginsberg, H.S.; Wood, W.D. & Mc Gart, M. - Staphylococci. 8th ed. In: - Microbiology. New York, Hoeber Medical, 1970. p. 727-740.
30. 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, 63: 219-223, 1938.
31. Delazari, I. & Leitão, M.F.F. - Staphylococcus aureus enteropatogenico em macarrão. Coletânea do Instituto de Tectnologia de Alimentos Campinas, 7: 485-497, 1976.
32. Debrlese, L.A. - Identification of pathogenic Staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. J. App. Bacteriol., 49: 1-11, 1980.
33. Debrlese, L.A.; Hajek, V.; Deding, P.; Meyer, S.A. & Scheifer, K.H. - Staphylococcus hyicus comb. nov. and Staphylococcus hyicus subsp chromagenes subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 28: 482-490, 1978.

34. Division of Bacterial Diseases, C.D.C. - Interstate common - source outbreaks of Staphylococcal food poisoning - North Carolina, Pennsylvania. M.M.W.R., 32: 183-184, 1983.
35. Division of Bacterial Diseases, C.D.C. - Staphylococcal food poisoning from turkey at a country club buffet - New Mexico, M.M.W.R., 35: 715-716, 721-722, 1988.
36. Division of Quarantine, C.D.C. - Staphylococcal food poisoning on a cruise ship. M.M.W.R., 32: 294-295, 1983.
37. Division of Quarantine, C.D.C. - Staphylococcal food poisoning on a cruise ship. JAMA, 1, no 250: 26-28, 1983.
38. Evenson, M.L.; Hinds, M.W.; Bernstein, R.S. & Berdoll, M.S. - Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of Staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. of Food Microbiol., 7: 311-316, 1988.

39. Fey, H.; Pfister, H. & Rluegg, O. - Comparative evaluation of different enzyme evaluation of different enzyme linked immunosorbent assay systems for the detection of Staphylococcal enterotoxins A,B,C and D. J. Clin. Microbiol., 19: 34-38, 1984.
40. Forsgren, A. - Significance of protein A production by Staphylococci. Infection and Immunity, 2: 672-673, 1970.
41. Friedman, M.E. - Inhibition of Staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures. J. Bacteriol., 92: 277-278, 1968.
42. Freed, R.C.; Enenson, M.L.; Reiser, R.F. & Bergdoll, M.S. - Enzyme-linked immunosolvent assay for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol., 44: 1349-1355, 1982.
43. Fung, D.Y.C.; Steinberg, D.H.; Miller, R.D.; Kurantwick, Y.N.J. & Murphy, I.F. - Thermal inactivation of Staphylococcal enterotoxins B and C. Appl. Microbiol., 26: 938-942, 1973.

44. Furnaletto, S.M.P. - Dados sobre a presença, em alimentos ou manipuladores de alimentos de bactérias responsáveis por toxinfecções de origem alimentar no Brasil. Anais do IV Seminário Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, S.P., 21-25 de Nov. de 1982.
45. Genigeorgis, C.; Reimann, H. & Sadler, W.W. - Production of enterotoxin in cured meats. J. Food Science, 34: 62-68, 1969.
46. Gomes, L.E.; Blanco, J.L.; Goyache, J.; de la Fuente, R.; Vazquez, J.A.; Ferri, E.F. & Suarez, G. Growth and enterotoxin A production by *S. aureus* 56 in Manchengo type cheese. J. Appl. Bacteriol., 61: 499-503, 1986.
47. Hartweel, S.; Marraro, R.U. & Harris, R.E. - Incidence of *Staphylococcus aureus* for an obstetric population. Obstetrics and Gynecology, 51: 603-605, 1978.
48. Henning, C.; Hillborgh, U.; Lindvall, K.; Marquardsen, D.; Sellers, J. & Wahlin, S. - Comparison of *Staphylococcus aureus* carriage and skin infection rates in Hospitals and Office Employees. J. Hygiene, 83: 437-444, 1979.

49. Hirooka, E.Y. & Muller, E.E. - Isolamento, caracterização e enteropatogenicidade de cepas de **Staphylococcus aureus** isolados de produtos cárneos comercializados em Londrina, Paraná. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2:123-133, 1982.
50. Hirooka, E.Y.; Muller, E.E.; Freitas, J.C.; Vicente, E.; Yoshimoto, Y. & Bergdoll, M.S. - Enterotoxigenicity of **S. intermedius** of canine origin. Int. J. of Food Microbiol., 7: 185-191, 1988.
51. Hooper, D.G.; Tatini, S.R. & Maltais, J.B. - Characterization of Staphylococci. Appl. Environ. Microbiol., 46: 649,660, 1983.
52. Huang, I.Y. & Bergdoll, M.S. - The primary structure of Staphylococcal enterotoxin B II Isolation, composition and sequence of Chymotryptic Peptides. The Journal of Biol. Chemical., 245: 3511-3517, 1970.
53. Huang, I.Y. & Bergdoll, M.S. - The primary structure of Staphylococcal enterotoxin B III. The cyanogen bromide Peptides of reduced and Aminoethylated enterotoxin B, and the complete Amino Acid sequence. The Journal of Biol. Chemical., 245: 3518-3525, 1970.

54. Huang, I.Y. apud Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In: C.F.S. Easman and G. Adlam, ed., Staphylococci and Staphylococcal Infection, Vol. 2, London, Academic Press, 1983. p. 559-598.
55. Humphrey, J.H. & White, R.G. - Serological aspects of the antigen - antibody reaction : the detection and measurement of antigen and antibody. In: Immunology for students of medicine. 3th ed. Oxford, Blackwell, 1971. p. 348-407.
56. Iaria, S.T. - Staphylococcus aureus enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do Município de São Paulo. Rev. de Saúde Pública, 15: 321-337, 1981.
57. Iaria, S.T.; Furnaleta, S.M.P. & Campos, M.L.C. - Pesquisa de Staphylococcus aureus enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo. Revista de Saúde Pública, 14: 93-100, 1980.
58. 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.

59. Ingran, M. & Kitchell, A. G. - Salt as preservative for foods. J. Food. Technol., 2: 1-15, 1967.
60. Jarvis, A.W. & Lawrence, R.C. - Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of Staphylococci. Appl. Microbiol., 19: 698-699, 1970.
61. Jarvis, A.W.; Lawrence, R.C.; Pritchard, G.C. - Production of Staphylococcal enterotoxins A, B and C under conditions of controlled pH and aeration. Infec. Immunity, 7: 847-853, 1973.
62. Johnson, H.M; Bukovle: J.A.; Kauffman, P.E. & Peeler, J.T. - Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. Appl. Microbiol., 22: 837-841, 1971.
63. Kato, E.; Khan, M.; Kujovich, L. & Bergdoll, M.S. - Production of enterotoxin A. Appl. Microbiol., 14: 966-972, 1966.
64. Kokan, N.P. & Bergdoll, M.S. - Detection of low-enterotoxin-producing **Staphylococcus aureus** steains. App. Environ. Microbiol., 53: 2675-2676, 1987.
65. Kloos, W.E. - Natural population of the genus **Staphylococcus**. Am. Rev. Microbiol., 34: 559-592, 1980.

66. Lachica, R.V.F.; Weiss, K.F. & Deibel, R.H. - Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stabile deoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 18: 126-127, 1969.
67. Lee, A.c.M. apud Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In: C.F.S. Easman and C. Adlam, ed., Staphylococci and Staphylococcal Infections, vol. 2, London, Academic Press, 1983. p. 558-598.
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 C2. Infect. and Immunity, 27: 431-434, 1980.
69. Lotter, L.P. & Genigeorgis, C.A. - Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. Appl. Microbiol., 28: 152-158, 1975.
70. Mandil, A. - Staphylococcus aureus em queijos tipo Minas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2: 233-241, 1982.

71. Mansfield, J.M.; Farkas, G.; Wienebe, A.A. & Glibert, R.J. - Studies on the growth and survival of **Staphylococcus aureus** in corned beef. J. Hyg., 91: 467-78, 1983.
72. Mc Lean, R.A.; Lilly, H.D. & Alford, J.A. - Effects of meat-curing salts and temperature on production of Staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol., 95: 1207-1211, 1968.
73. Melconian, A.K.; Flandrois, F.P. & Fleurette, J. - Modified method for production and purification of **Staphylococcus aureus** enterotoxin B. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1140-1143, 1983.
74. Minor, T.E. & Marth, E.H. - **Staphylococcus aureus** and staphylococcal food intoxications. A review I. J. Milk Food Technol., 34: 557-584, 1971.
75. Minor, I.E. & Marth, E.H. - Staphylococcal food poisoning. A review I. Characteristics and isolation of Staphylococci properties of enterotoxins, and epidemiology of Staphylococcal intoxications. The Ind. J. Nutr. Dietet., 9: 161-186, 1972.

76. Minor, T.E. & Marth, E.H. - *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food intoxications. A review II. J. Milk Food Technol., 35: 21-29, 1972.
77. Minor, T.E. & Marth, E.H. - Staphylococci and their significance in foods. Amsterdam, Elsevier, 1976. p. 297.
78. Morita, T.N. & Woodburn, M.J. - Homogeneous enzyme immune assay for Staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immunity, 21: 666-668, 1978.
79. Morse, S.A. & Baldwin, J.N. - Regulation of Staphylococcal enterotoxin B: effect of thiamine starvation. Appl. Microbiol., 22: 242-249, 1971.
80. Morse, S.A. & Baldwin, J.N. - Factors affecting the regulation of Staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immunity, 7: 839-846, 1973.
81. Morse, S.A. & Mah, R.A. - Regulation of Staphylococcal enterotoxin B : Effect of anaerobic shock. Appl. Microb., 25: 553-557, 1973.
82. Morse, S.A.; Mah, R.A. & Dobrogosz, W.J. - Regulation of Staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol., 98: 4-9, 1969.

83. Olsvik, O.; Berdal, B.P.; Fossum, K. & Ornlund, T. - Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to origin of the strains. Acta Path. Microb. Scan., 898: 423-426, 1981.
84. Olsvik, O.; Fossum, K. & Berdal, B.P. - Staphylococcal enterotoxin A, B and C, produced by Coagulase-Negative strains within the family *Micrococcaceae*. Acta Path. Microb. Scan., 908: 441-444, 1982.
85. Ouchterlony, O. - Antigen antibody reactions in gels. Acta Path. Microb. Scan., 32: 231-240, 1953.
86. Oudin, J. - Specific precipitation in gels. Methods Med. Res., 5: 335-378, 1952.
87. 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.
88. Pereira, J.L. & Salzberg, S.P. - Regulation of Staphylococcal enterotoxins A and B produced by strain 5-6. J. of Food Protection, 45: 1306-1309, 1982.

89. Petrás, P. & Masková, L. - Detection of Staphylococcal enterotoxigenicity IV. Strains isolated in 1981 and 1982. J. Of. Hyg. Epidemiol. Microbiol. and Immunol., 28: 287-295, 1984.
90. Read, R.B. & Bradshaw, J.G. - Thermal inactivation of Staphylococcal enterotoxin B in Veronal Buffer. Appl. Microbiol., 14: 130-134, 1966.
91. Read, R.B. & Bradshaw, J.G. - Irradiation of Staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., 15: 603-605, 1967.
92. Reali, D. - Enterotoxin A and B. Production in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from human beings and foods. J. Hyg., 88: 103-106, 1982.
93. Reiser, R.F.; Robbins, R.N.; Noieto, A.L.; Khoe, G.P. & Bergdoll, M.S. - Identification, purification and some physicochemical properties of Staphylococcal enterotoxin C3. Infect. and Immunity, 45: 625-630, 1984.
94. Reiser, R.F. & Weiss, K.F. - Productive of Staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. Appl. Microbiol., 18: 1041-1043, 1969.

95. Reyes, L.; Mota, L. Costarrica, L. & Parrilla, C. -
Determination of the enterotoxigenicity of
Staphylococcus aureus strains isolated from cheese.
Rev. Latinoam. Microbiol., 26: 277-283, 1984.
96. Robbins, R.; Gould, S. & Bergdoll, M.S. - Detecting the
enterotoxigenicity of **Staphylococcus aureus**
strains. Appl. Microbiol., 28: 946-950, 1974.
97. Santos, E.S. & Genigeorgis, G. - Survival and growth of
S. aureus in commercial manufactured Brazilian Minas
cheese. J. Food Protection Anes., 44: 177-184, 1981.
98. Saunders, G.C. & Bartlett, M.L. - Double-antibody
solid-phase enzyme immunoassay for the detection of
Staphylococcal enterotoxin A. Appl. Environ.
Microbiol., 34: 518-522, 1977.
99. Sawage, J.P. - Le monde actérien O.R.L. En:
L'antibiotherapie en ORL. Guide des lésion bactériennes
rencontrées en pathologie cervico-faciale. Beecham-
Sevigne, 1979.
100. Schantz, E.J.; Roessler, W.G.; Wagman, J.; Spero, L.;
Dunnery, D.A. & Bergdoll, M.S. - Purification of
Staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, 4: 1011-
1016, 1965.

101. Silverman, S.J. - Serological assay of culture filtrates for Staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol., 85: 955-956, 1963.
102. Silverman, S.J.; Knott, A.R. & Howard, A. - Rapid sensitive assay for Staphylococcal enterotoxins and a comparison of serological methods. Appl. Microbiol., 16: 1019-1023, 1968.
103. Simkovicova, M. & Gilbert, R.J. - Serological detection of enterotoxin from food-poisoning strains of Staphylococcus aureus. J. Med. Microbiol., 4: 19-30, 1971.
104. Smith, J.L.; Bencivengo, M.M.; Buchanan, R.L. & Kunsch, C.A. - Enterotoxin A production in Staphylococcus aureus : inhibition by glucose. Arch. Microbiol., 144: 131-136, 1986.
105. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. & Holt, J.G. - Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. no 2, 1st ed. William & Wilkins. Baltimore, 1986. p. 999-1035.

106. Spero, L. apud Bergdoll, M.S. - Enterotoxin. In: Easman and C. Adlam, ed., Staphylococci and Staphylococcal Infections, vol. 2, London, Academic Press, 1983. p. 559-598.
107. Spero, L. & Morlock, B.A. (1979) apud Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In: C.F.S. Easman and C. Adlam, ed. Staphylococci and Staphylococcal Infections, vol. 2, London, Academic Press, 1983. p. 559-598.
108. Surgalla, M.J.; Kadany, J.D.; Bergdoll, M.S. & Dack, G.M. - Staphylococcal enterotoxin: production methods. J. Infect. Diseases, 89: 180-184, 1951.
109. Tatini, S.R. - Thermal stability of enterotoxins in foods. J. Milk Food Technol., 39: 432-438, 1976.
110. Tatini, S.R.; Cords, B.R. & Gramoli, J. - Screening for Staphylococcal enterotoxins in food. J. Food Technol., 30:64-74, 1976.
111. Thatcher, F.S. - Recommended methods for microbiological examination. In: - Microorganisms in foods. Toronto, Toronto Press, 1988. p. 114-122.

112. Thompson, N.E.; Razdan, M.; Kuntzmann, G.; Aschenback, J.M.; Enenson, M.L. & Bergdoll, M.S. - Detection of Staphylococcal enterotoxins by enzyme - linked immunosolvent assays and radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. Appl. Environ. Microbiol., 51: 885-890, 1986.
113. Tompkim, R.B.; Ambrosino, S.M. & Stozek, S.K. - Effect of pH, sodium chloride and sodium nitrite on enterotoxin a production. Appl. Microbiol., 26: 833-837, 1973.
114. Troller, J.A. Effect of wates activity on enterotoxin B production and growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 21: 425-439, 1971.
115. Troller, J.A. - Effect of water activity on enterotoxin A - production and growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 24: 440-443, 1972.
116. Weirether, F.J.; Lewis, E.E.; Rosenwald, A.J. & Lincoln, R.E. - Rapid quantitative serological assay of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., 14:284-291, 1966.

117. Wilson, D. - Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. Rev. de Saúde Pública, São Paulo, 11: 1-11, 1981.
118. Wu, C.H. & Bergdoll, M.S. - Stimulation of enterotoxin B production I. Stimulation by fractions from a pancreatic digest casein. Infect. Immunity, 3: 777-783, 1971.
119. Zuorong, L.; Reiser, R.F. & Bergdoll, M.S. - Chromatofocusing in the purification of Staphylococcal enterotoxin D. J. of Clin. Microbiol., 26: 1236-1237, 1988.

TABELA 01

CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *S. AUREUS* EM FRASCOS DE MEIO
TEL SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM A 37° C

| LINHAGEM | LOG. NÚMERO DE <i>S. AUREUS</i> / mL * | | | | | |
|----------|--|------|------|------|------|------|
| | TEMPO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | | |
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 48 |
| 396 | 6,52 | 7,57 | 8,60 | 8,71 | 8,86 | 8,91 |
| 427 | 6,80 | 7,75 | 8,61 | 8,75 | 8,89 | 8,86 |
| 464 | 6,49 | 7,63 | 8,83 | 8,86 | 8,89 | 8,93 |
| 542 | 6,86 | 7,96 | 8,89 | 9,00 | 9,05 | 9,08 |
| 472 | 6,75 | 7,88 | 8,86 | 8,99 | 9,06 | 9,07 |

* Concentração celular obtida por leituras de D.O.

TABELA 02

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D EM FRASCOS DE MEIO TEL
SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM A 37º C

| LINHAGEM | ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D (ng / mL)* | | | | | |
|----------|--|------|-------|-------|-------|-------|
| | TEMPO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | | |
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 48 |
| 396 | 7,0 | 11,8 | 37,1 | 72,3 | 79,6 | 80,9 |
| 427 | 10,0 | 15,8 | 31,2 | 51,2 | 53,0 | 55,2 |
| 464 | ND*** | 6,0 | 14,7 | 30,2 | 33,1 | 34,8 |
| 542 | ND | ND | 5,8 | 13,1 | 17,1 | 20,0 |
| 472** | 29,3 | 60,3 | 111,7 | 320,0 | 326,1 | 340,0 |

* Análise pelo método imunoenzimático ("ELISA").

** Análise de enterotoxina diretamente no sobrenadante livre de células.

*** ND = Não Detectável.

TABELA 03

TAXA DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOGÓCICA D EM FRASCOS DE
MEIO TEL SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM A 37º C

| LINHAGEM | ENTEROTOXINA ESTAFILOGÓCICA D (ng/mL/h) | | | | | |
|----------|---|------|-------|-------|-------|-------|
| | INTERVALOS DE TEMPO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | | |
| | 0-8 | 8-12 | 12-16 | 16-20 | 20-24 | 24-48 |
| 396 | 0,09 | 1,20 | 6,32 | 8,80 | 1,82 | 0,05 |
| 427 | 1,25 | 1,45 | 3,85 | 5,00 | 0,45 | 0,09 |
| 464 | 0,00 | 1,50 | 2,17 | 3,87 | 0,72 | 0,07 |
| 542 | 0,00 | 0,00 | 1,45 | 1,82 | 1,00 | 0,12 |
| 472 | 3,66 | 7,75 | 12,85 | 52,07 | 1,52 | 0,58 |

TABELA 04

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓGICA D EM CULTURAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE SACO DE DIÁLISE EM MEIO TEL, SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM A 37° C

| LINHAGEM | ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓGICA D (ng / mL) | | | | | |
|----------|---|-------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | TEMPO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | | |
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 48 |
| 396 | 67,8 | 118,4 | 201,6 | 506,0 | 762,0 | 788,6 |
| 427 | 92,5 | 153,8 | 218,3 | 375,3 | 495,9 | 529,6 |
| 464 | 2,5 | 64,2 | 165,3 | 286,1 | 352,3 | 377,2 |
| 542 | ND* | ND | 62,6 | 86,5 | 106,2 | 20,0 |
| 472 | 210,0 | 405,3 | 2,15x10 ³ | 3,28x10 ³ | 3,69x10 ³ | 3,8x10 ³ |

* ND = Não Detectável.

TABELA 05

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D EM CULTURAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE SACO DE DIÁLISE
COM MEIO TEL, SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM E A 37º C.

| LINHAGEM | | ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D (ng / mL) | | | | | |
|----------|------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | TEMPO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | | |
| | | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 48 |
| 396 | MÉTODO 1* | 67,8 | 118,4 | 201,6 | 506,0 | 762,0 | 788,6 |
| | MÉTODO 2** | ND*** | ND | ND | < 2000 | < 2000 | < 2000 |
| 427 | MÉTODO 1 | 92,5 | 153,8 | 218,3 | 375,3 | 495,9 | 529,8 |
| | MÉTODO 2 | ND | ND | ND | < 2000 | < 2000 | < 2000 |
| 464 | MÉTODO 1 | 2,5 | 64,2 | 165,3 | 286,1 | 352,3 | 377,2 |
| | MÉTODO 2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 542 | MÉTODO 1 | ND | ND | 62,6 | 86,5 | 106,2 | 114,3 |
| | MÉTODO 2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 472 | MÉTODO 1 | 219,0 | 405,3 | 2150 | 3280 | 3690 | 3800 |
| | MÉTODO 2 | < 2000 | < 2000 | < 2000 | 2000 | 2000 | > 2000 |

* Método imunoenzimático (ELISA)

** Método de dupla difusão em gel modificado (OSP)

*** Não Detectável

TABELA 06

TAXA DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D EM FRASCOS CULTURAS
OBTIDAS PELO MÉTODO DE SAGO DE DIALISE EM MEIO TEL, SOB A AGITAÇÃO
DE 250 RPM A 370 C

| LINHAGEM | ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D (ng/mL/h) | | | | |
|----------|---|--------|-------|--------|-------|
| | PERÍODO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | |
| | 8-12 | 12-16 | 16-20 | 20-24 | 24-48 |
| 396 | 12,65 | 20,80 | 76,12 | 64,00 | 1,10 |
| 427 | 15,32 | 16,12 | 39,25 | 30,15 | 1,41 |
| 464 | 15,42 | 25,27 | 30,20 | 16,55 | 1,04 |
| 542 | ND* | 3,91 | 5,97 | 4,92 | 0,33 |
| 472 | 48,80 | 436,17 | 282,5 | 103,00 | 4,5 |

* ND = Não Detectável

TABELA 07

COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D PELOS MÉTODOS DE CULTURA COM SACO DE DIÁLISE E EM FRASCOS UTILIZANDO-SE MEIO TEL, SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM E A 37° C.

| LINHAGEM | | ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D (ng / mL) | | | | | |
|----------|------------|---|-------|---------|---------|---------|---------|
| | | TEMPO DE INCUBAÇÃO (h) | | | | | |
| | | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 48 |
| 396 | MÉTODO 1* | 7,0 | 11,8 | 37,1 | 72,3 | 79,6 | 80,9 |
| | MÉTODO 2** | 67,8 | 118,4 | 201,6 | 506,0 | 76,2 | 788,6 |
| 427 | MÉTODO 1 | 10,0 | 15,8 | 31,2 | 51,2 | 53,0 | 55,2 |
| | MÉTODO 2 | 92,5 | 153,8 | 218,3 | 375,3 | 495,9 | 529,8 |
| 464 | MÉTODO 1 | ND*** | 6,0 | 14,7 | 30,2 | 33,1 | 34,8 |
| | MÉTODO 2 | 2,5 | 64,2 | 165,3 | 286,1 | 352,3 | 377,2 |
| 542 | MÉTODO 1 | ND | ND | 5,8 | 13,1 | 17,1 | 20,0 |
| | MÉTODO 2 | ND | ND | 62,6 | 86,5 | 106,2 | 114,3 |
| 472 | MÉTODO 1 | 29,3 | 60,3 | 111,7 | 320,0 | 326,1 | 340,0 |
| | MÉTODO 2 | 210,1 | 405,3 | 2.150,0 | 3.280,0 | 3.692,0 | 3.800,0 |

* Crescimento de cultura em frascos Erlenmeyer

** Crescimento de cultura pelo método de saco de diálise

*** Não Detectável

TABELA 08

3

RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA D EM CREME INOCULADO COM 10^8 CÉLULAS/g
DE S. AUREUS APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)

| TEMPERATURA (C) | LINHAGEN | 24 | | | | | 48 | | | | |
|-------------------|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|---------------|
| | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | |
| | | MESOFILOS (UFC / g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | MESOFILOS (UFC / g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) |
| 25 | 396 | 6 | 4 | | 4 | | 7 | 4 | | 7 | |
| | | $1,4 \times 10^6$ | $5,0 \times 10^4$ | ND* | $1,3 \times 10^4$ | ND | $6,1 \times 10^5$ | $3,5 \times 10^4$ | 1,2 | $7,3 \times 10^6$ | 3,2 |
| | 427 | 6 | 3 | | 5 | | 5 | 4 | | 7 | |
| | | $4,5 \times 10^6$ | $8,3 \times 10^6$ | ND | $6,9 \times 10^6$ | ND | $1,4 \times 10^6$ | $6,1 \times 10^6$ | ND | $8,5 \times 10^6$ | 3,1 |
| | 464 | 8 | 6 | | 6 | | 9 | 6 | | 8 | |
| | | $2,3 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^8$ | ND | $7,5 \times 10^8$ | ND | $1,3 \times 10^8$ | $7,2 \times 10^8$ | ND | $6,5 \times 10^8$ | 2,5 |
| | 542 | 6 | 5 | | 6 | | 7 | 6 | | 8 | |
| | | $1,4 \times 10^6$ | $4,3 \times 10^6$ | ND | $1,2 \times 10^6$ | ND | $8,0 \times 10^6$ | $8,6 \times 10^6$ | ND | $1,2 \times 10^8$ | 2,8 |
| 472 | 4 | 4 | | 6 | | 5 | 5 | | 8 | | |
| | $3,1 \times 10^4$ | $9,8 \times 10^4$ | ND | $2,2 \times 10^6$ | 3,5 | $7,0 \times 10^6$ | $5,0 \times 10^6$ | 5,2 | $1,3 \times 10^8$ | 7,6 | |
| 36 | 396 | 6 | 5 | | 4 | | 7 | 6 | | 6 | |
| | | $5,6 \times 10^6$ | $3,6 \times 10^6$ | 1,5 | $7,9 \times 10^6$ | 4,1 | $3,5 \times 10^6$ | $1,2 \times 10^6$ | 3,5 | $3,6 \times 10^6$ | 5,3 |
| | 427 | 5 | 4 | | 6 | | 7 | 5 | | 8 | |
| | | $9,3 \times 10^5$ | $5,3 \times 10^5$ | ND | $9,3 \times 10^5$ | 3,5 | $1,0 \times 10^6$ | $4,2 \times 10^6$ | ND | $1,2 \times 10^6$ | 5,6 |
| | 464 | 8 | 6 | | 7 | | 8 | 7 | | 8 | |
| | | $1,5 \times 10^8$ | $4,2 \times 10^8$ | ND | $2,5 \times 10^8$ | 2,2 | $3,3 \times 10^8$ | $1,8 \times 10^8$ | 1,3 | $3,5 \times 10^8$ | 4,8 |
| | 542 | 6 | 6 | | 6 | | 8 | 6 | | 9 | |
| | | $1,7 \times 10^6$ | $1,9 \times 10^6$ | 1,6 | $2,5 \times 10^6$ | 2,3 | $2,1 \times 10^6$ | $9,3 \times 10^6$ | 2,3 | $2,3 \times 10^6$ | 5,3 |
| 472 | 5 | 6 | | 7 | | 5 | 7 | | 8 | | |
| | $2,0 \times 10^5$ | $1,7 \times 10^6$ | 5,2 | $5,6 \times 10^6$ | 10,6 | $9,9 \times 10^6$ | $6,5 \times 10^6$ | 12,4 | $1,5 \times 10^8$ | 16,2 | |
| 37 | 396 | 8 | 7 | | 6 | | 7 | 5 | | 6 | |
| | | $1,8 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^8$ | 2,9 | $1,2 \times 10^8$ | 5,6 | $5,2 \times 10^8$ | $7,6 \times 10^8$ | 4,2 | $6,7 \times 10^8$ | 8,8 |
| | 427 | 6 | 5 | | 7 | | 8 | 7 | | 8 | |
| | | $2,7 \times 10^6$ | $6,8 \times 10^6$ | 0,9 | $9,5 \times 10^6$ | 4,1 | $1,1 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | 2,9 | $3,9 \times 10^7$ | 7,1 |
| | 464 | 8 | 7 | | 8 | | 8 | 7 | | 8 | |
| | | $3,3 \times 10^8$ | $3,2 \times 10^8$ | 0,9 | $3,0 \times 10^8$ | 3,5 | $5,9 \times 10^8$ | $1,7 \times 10^8$ | 2,1 | $7,7 \times 10^8$ | 5,2 |
| | 542 | 7 | 6 | | 6 | | 8 | 7 | | 8 | |
| | | $1,5 \times 10^7$ | $3,2 \times 10^7$ | 3,3 | $3,2 \times 10^7$ | 4,6 | $1,3 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | 5,5 | $1,9 \times 10^7$ | 7,1 |
| 472 | 6 | 7 | | 8 | | 7 | 8 | | 9 | | |
| | $1,4 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ | 15,8 | $2,2 \times 10^6$ | 27,4 | $2,3 \times 10^6$ | $8,5 \times 10^6$ | 18,5 | $2,5 \times 10^6$ | 29,6 | |

* ND = NÃO DETECTÁVEL

TABELA 09

RELACÃO ENTRE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA D EM CRENE INOCULADO COM 10⁴ CÉLULAS/g DE S. AUREUS APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)

| TEMPERATURA (C) | LINHAGEM | 24 | | | | | 48 | | | | |
|-------------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | |
| | | MESOFILOS (UFC / g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | MESOFILOS (UFC / g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) |
| 25 | 396 | 6 | 5 | | 4 | | 7 | 6 | | 3 | |
| | | 4,3x10 ⁶ | 1,7x10 ⁵ | ND* | 2,9x10 ⁴ | 1,2 | 6,9x10 ⁷ | 1,4x10 ⁶ | 2,1 | 6,0x10 ³ | 3,5 |
| | 427 | 6 | 3 | | 7 | | 5 | 4 | | 8 | |
| | | 1,7x10 ⁶ | 7,0x10 ³ | ND | 6,3x10 ⁷ | 2,4 | 4,5x10 ⁹ | 2,1x10 ⁷ | ND | 8,2x10 ⁸ | 4,3 |
| | 464 | 8 | 6 | | 7 | | 9 | 7 | | 8 | |
| | | 2,8x10 ⁸ | 3,2x10 ⁶ | ND | 1,9x10 ⁷ | 1,4 | 2,3x10 ⁸ | 2,4x10 ⁷ | ND | 2,4x10 ⁸ | 2,9 |
| | 542 | 8 | 6 | | 7 | | 8 | 6 | | 8 | |
| | | 4,1x10 ⁸ | 7,3x10 ⁶ | ND | 2,4x10 ⁷ | 2,1 | 7,3x10 ⁸ | 3,4x10 ⁶ | ND | 4,2x10 ⁸ | 2,8 |
| | 472 | 6 | 5 | | 5 | | 6 | 3 | | 6 | |
| | | 1,2x10 ⁶ | 1,7x10 ⁵ | ND | 5,5x10 ⁵ | 9,7 | 8,0x10 ⁶ | 5,8x10 ³ | 6,0 | 5,8x10 ⁶ | 16,5 |
| 30 | 396 | 7 | 6 | | 4 | | 8 | 7 | | 5 | |
| | | 4,4x10 ⁷ | 4,7x10 ⁶ | 2,8 | 9,6x10 ⁴ | 4,3 | 3,4x10 ⁸ | 1,3x10 ⁷ | 4,5 | 4,0x10 ⁹ | 5,6 |
| | 427 | 6 | 4 | | 8 | | 7 | 6 | | 9 | |
| | | 1,4x10 ⁶ | 5,0x10 ⁴ | ND | 5,6x10 ⁸ | 4,6 | 1,2x10 ⁷ | 4,2x10 ⁶ | 2,5 | 1,2x10 ⁹ | 6,0 |
| | 464 | 9 | 6 | | 8 | | 7 | 6 | | 8 | |
| | | 2,3x10 ⁹ | 6,4x10 ⁶ | ND | 2,1x10 ⁸ | 3,9 | 5,4x10 ⁷ | 3,3x10 ⁶ | 2,5 | 4,9x10 ⁸ | 4,8 |
| | 542 | 7 | 6 | | 7 | | 8 | 7 | | 8 | |
| | | 7,2x10 ⁷ | 2,9x10 ⁶ | 2,1 | 6,2x10 ⁷ | 3,1 | 2,4x10 ⁸ | 2,1x10 ⁷ | 3,4 | 9,3x10 ⁸ | 5,9 |
| | 472 | 6 | 5 | | 5 | | 6 | 5 | | 7 | |
| | | 3,9x10 ⁶ | 3,1x10 ⁵ | 8,4 | 5,3x10 ⁵ | 15,0 | 9,2x10 ⁶ | 1,4x10 ⁵ | 14,8 | 4,0x10 ⁷ | 16,9 |
| 37 | 396 | 8 | 5 | | 6 | | 7 | 6 | | 7 | |
| | | 1,7x10 ⁸ | 9,3x10 ⁵ | 3,9 | 4,3x10 ⁶ | 5,4 | 4,7x10 ⁸ | 1,2x10 ⁶ | 6,3 | 1,9x10 ⁷ | 7,1 |
| | 427 | 7 | 6 | | 8 | | 8 | 7 | | 7 | |
| | | 1,6x10 ⁷ | 2,8x10 ⁶ | 3,4 | 1,0x10 ⁸ | 6,7 | 1,3x10 ⁸ | 2,5x10 ⁷ | 4,6 | 2,0x10 ⁷ | 8,1 |
| | 464 | 9 | 7 | | 8 | | 7 | 6 | | 9 | |
| | | 3,1x10 ⁹ | 8,4x10 ⁷ | 2,4 | 3,6x10 ⁸ | 6,2 | 9,7x10 ⁷ | 4,7x10 ⁶ | 3,7 | 1,4x10 ⁹ | 7,0 |
| | 542 | 8 | 7 | | 8 | | 8 | 8 | | 8 | |
| | | 2,3x10 ⁸ | 5,2x10 ⁷ | 3,9 | 1,7x10 ⁸ | 5,2 | 1,5x10 ⁸ | 1,8x10 ⁸ | 6,3 | 4,4x10 ⁸ | 8,3 |
| | 472 | 7 | 6 | | 7 | | 8 | 7 | | 7 | |
| | | 5,8x10 ⁷ | 4,3x10 ⁶ | 18,1 | 2,1x10 ⁷ | 28,1 | 2,8x10 ⁸ | 6,6x10 ⁷ | 23,7 | 7,6x10 ⁷ | 35,9 |

* ND = NÃO DETECTÁVEL

TABELA 10

3

RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA D EM PRESUNTO COZIDO INOCULADO COM 10^8 CÉLULAS/g DE S. AUREUS APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)

| TEMPERATURA (C) | LINHAGEM | 24 | | | | | 48 | | | | |
|-------------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | |
| | | MESOFILOS (UFC / g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | MESOFILOS (UFC / g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) | S. AUREUS (UFC / g) | EED (ng/g) |
| 25 | 396 | 8 | 5 | | 5 | | 8 | 5 | | 7 | |
| | | $6,5 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^5$ | ND* | $7,0 \times 10^5$ | ND | $8,9 \times 10^8$ | $8,4 \times 10^5$ | ND | $1,6 \times 10^8$ | 2,6 |
| | 427 | 7 | 5 | | 6 | | 8 | 5 | | 8 | |
| | | $3,0 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^5$ | 1,0 | $1,5 \times 10^6$ | 1,6 | $4,5 \times 10^8$ | $2,2 \times 10^5$ | 2,4 | $3,8 \times 10^8$ | 3,2 |
| | 464 | 9 | 4 | | 6 | | 9 | 5 | | 7 | |
| | | $1,1 \times 10^8$ | $4,8 \times 10^4$ | ND | $1,7 \times 10^6$ | ND | $3,8 \times 10^9$ | $8,5 \times 10^5$ | ND | $3,1 \times 10^7$ | ND |
| | 542 | 8 | 5 | | 6 | | 8 | 6 | | 8 | |
| | | $1,0 \times 10^8$ | $9,5 \times 10^4$ | ND | $9,8 \times 10^6$ | ND | $5,7 \times 10^8$ | $1,3 \times 10^6$ | ND | $2,8 \times 10^8$ | ND |
| | 472 | 8 | 5 | | 6 | | 8 | 5 | | 7 | |
| | | $7,1 \times 10^8$ | $2,8 \times 10^5$ | ND | $3,2 \times 10^6$ | 8,1 | $6,8 \times 10^8$ | $7,2 \times 10^5$ | 6,5 | $8,6 \times 10^8$ | 10,1 |
| 30 | 396 | 9 | 5 | | 8 | | 9 | 5 | | 9 | |
| | | $3,4 \times 10^8$ | $6,2 \times 10^5$ | 1,8 | $1,9 \times 10^7$ | 5,7 | $9,7 \times 10^9$ | $9,7 \times 10^6$ | 3,7 | $1,8 \times 10^9$ | 9,2 |
| | 427 | 8 | 5 | | 9 | | 9 | 6 | | 9 | |
| | | $3,0 \times 10^8$ | $5,6 \times 10^5$ | ND | $2,0 \times 10^7$ | 2,5 | $1,2 \times 10^9$ | $8,0 \times 10^6$ | 2,3 | $1,9 \times 10^9$ | 4,1 |
| | 464 | 8 | 4 | | 6 | | 9 | 6 | | 8 | |
| | | $9,0 \times 10^8$ | $6,3 \times 10^4$ | ND | $3,5 \times 10^6$ | 4,6 | $1,4 \times 10^9$ | $1,8 \times 10^6$ | ND | $3,6 \times 10^8$ | 7,4 |
| | 542 | 8 | 6 | | 8 | | 8 | 6 | | 9 | |
| | | $2,2 \times 10^8$ | $3,2 \times 10^6$ | ND | $8,0 \times 10^8$ | 4,5 | $7,3 \times 10^8$ | $8,7 \times 10^6$ | 4,0 | $8,7 \times 10^9$ | 5,9 |
| | 472 | 8 | 5 | | 8 | | 8 | 6 | | 9 | |
| | | $8,8 \times 10^8$ | $6,7 \times 10^5$ | 6,3 | $2,0 \times 10^8$ | 17,6 | $7,3 \times 10^8$ | $1,7 \times 10^6$ | 12,5 | $1,2 \times 10^9$ | 26,5 |
| 37 | 396 | 9 | 5 | | 8 | | 10 | 6 | | 9 | |
| | | $7,5 \times 10^8$ | $6,8 \times 10^5$ | 3,6 | $8,9 \times 10^8$ | 7,2 | $1,1 \times 10^{10}$ | $2,3 \times 10^6$ | 5,0 | $6,5 \times 10^9$ | 9,8 |
| | 427 | 9 | 6 | | 10 | | 10 | 7 | | 10 | |
| | | $2,9 \times 10^9$ | $3,6 \times 10^6$ | 5,9 | $1,3 \times 10^{10}$ | 9,6 | $2,2 \times 10^{10}$ | $1,5 \times 10^7$ | 9,3 | $5,2 \times 10^{10}$ | 15,1 |
| | 464 | 9 | 6 | | 8 | | 9 | 8 | | 9 | |
| | | $2,2 \times 10^9$ | $1,2 \times 10^6$ | 1,2 | $2,8 \times 10^8$ | 5,7 | $1,5 \times 10^9$ | $1,9 \times 10^8$ | 3,7 | $3,1 \times 10^9$ | 8,4 |
| | 542 | 9 | 6 | | 9 | | 9 | 7 | | 10 | |
| | | $7,4 \times 10^9$ | $9,9 \times 10^6$ | 3,8 | $1,9 \times 10^9$ | 4,6 | $9,8 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^7$ | 4,4 | $5,8 \times 10^{10}$ | 8,2 |
| | 472 | 9 | 5 | | 9 | | 9 | 7 | | 9 | |
| | | $1,7 \times 10^9$ | $8,6 \times 10^5$ | 20,2 | $3,7 \times 10^{10}$ | 37,0 | $3,5 \times 10^{10}$ | $3,6 \times 10^7$ | 32,6 | $2,1 \times 10^{10}$ | 46,0 |

* ND = NÃO DETECTÁVEL

TABELA 11

RELACÃO ENTRE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA D EM PRESUNTO COZIDO INOCULADO COM 10^4 CÉLULAS/g DE *S. AUREUS* APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)

| TEMPERATURA (°C) | LINHAGEM | 24 | | | | | 48 | | | | |
|------------------|---------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------|
| | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | | NÃO ESTERILIZADO | | | ESTERILIZADO | |
| | | MESOFILOS (UFC / g) | <i>S. AUREUS</i> (UFC / g) | EED (ng/g) | <i>S. AUREUS</i> (UFC / g) | EED (ng/g) | MESOFILOS (UFC / g) | <i>S. AUREUS</i> (UFC / g) | EED (ng/g) | <i>S. AUREUS</i> (UFC / g) | EED (ng/g) |
| 25 | 396 | 8 | 5 | | 6 | | 9 | 5 | | 7 | |
| | | 5,3x10 ⁷ | 2,9x10 ⁸ | ND* | 4,5x10 ⁶ | 1,7 | 3,1x10 ⁸ | 3,9x10 ⁸ | ND | 4,8x10 ⁸ | 2,8 |
| | 427 | 7 | 5 | | 6 | | 8 | 6 | | 8 | |
| | | 5,5x10 ⁸ | 2,4x10 ⁸ | ND | 4,5x10 ⁶ | 3,1 | 6,7x10 ⁸ | 8,0x10 ⁸ | 2,6 | 4,2x10 ⁸ | 3,5 |
| | 464 | 9 | 4 | | 6 | | 9 | 6 | | 7 | |
| | | 1,3x10 ⁸ | 5,6x10 ⁸ | ND | 6,2x10 ⁶ | ND | 1,3x10 ⁸ | 1,8x10 ⁸ | ND | 8,1x10 ⁸ | ND |
| 542 | 8 | 4 | | 7 | | 8 | 6 | | 7 | | |
| | 1,8x10 ⁸ | 9,9x10 ⁸ | ND | 2,1x10 ⁶ | ND | 4,9x10 ⁸ | 5,2x10 ⁸ | ND | 6,3x10 ⁸ | ND | |
| 472 | 8 | 5 | | 6 | | 8 | 6 | | 8 | | |
| | 4,3x10 ⁸ | 8,3x10 ⁸ | 3,5 | 8,2x10 ⁶ | 8,1 | 9,3x10 ⁸ | 1,0x10 ⁸ | 6,2 | 1,3x10 ⁸ | 13,7 | |
| 36 | 396 | 8 | 6 | | 8 | | 9 | 6 | | 9 | |
| | | 3,6x10 ⁸ | 3,1x10 ⁸ | 3,2 | 6,3x10 ⁶ | 6,2 | 7,8x10 ⁸ | 7,0x10 ⁸ | 4,3 | 3,3x10 ⁸ | 13,1 |
| | 427 | 8 | 5 | | 9 | | 9 | 7 | | 10 | |
| | | 8,2x10 ⁸ | 9,2x10 ⁸ | 1,4 | 6,8x10 ⁶ | 3,7 | 1,2x10 ⁹ | 3,0x10 ⁸ | 3,6 | 8,1x10 ⁸ | 5,3 |
| | 464 | 9 | 4 | | 9 | | 9 | 8 | | 9 | |
| | | 1,2x10 ⁸ | 8,6x10 ⁸ | 1,2 | 4,5x10 ⁶ | 5,8 | 2,8x10 ⁸ | 9,4x10 ⁸ | 2,8 | 6,9x10 ⁸ | 9,7 |
| 542 | 8 | 6 | | 9 | | 9 | 7 | | 10 | | |
| | 3,0x10 ⁸ | 1,2x10 ⁸ | ND | 1,2x10 ⁶ | 8,2 | 1,1x10 ⁹ | 8,9x10 ⁸ | 1,8 | 1,6x10 ⁸ | 18,7 | |
| 472 | 8 | 6 | | 9 | | 9 | 7 | | 9 | | |
| | 8,3x10 ⁸ | 4,3x10 ⁸ | 12,4 | 1,3x10 ⁶ | 26,5 | 1,2x10 ⁹ | 9,8x10 ⁸ | 24,0 | 8,3x10 ⁸ | 38,8 | |
| 37 | 396 | 9 | 6 | | 9 | | 10 | 6 | | 9 | |
| | | 9,6x10 ⁸ | 2,2x10 ⁸ | 4,2 | 1,9x10 ⁶ | 8,8 | 3,9x10 ⁸ | 9,7x10 ⁸ | 6,2 | 8,6x10 ⁸ | 14,2 |
| | 427 | 10 | 6 | | 9 | | 10 | 7 | | 10 | |
| | | 1,2x10 ⁸ | 9,7x10 ⁸ | 6,8 | 8,2x10 ⁶ | 10,3 | 2,5x10 ⁸ | 2,8x10 ⁸ | 7,9 | 8,7x10 ⁸ | 16,3 |
| | 464 | 9 | 6 | | 9 | | 9 | 8 | | 10 | |
| | | 7,3x10 ⁸ | 3,5x10 ⁸ | 2,6 | 6,1x10 ⁶ | 5,8 | 8,3x10 ⁸ | 7,6x10 ⁸ | 4,1 | 1,6x10 ⁸ | 8,2 |
| 542 | 9 | 6 | | 9 | | 9 | 7 | | 10 | | |
| | 3,0x10 ⁸ | 8,7x10 ⁸ | 4,4 | 7,7x10 ⁶ | 5,7 | 5,2x10 ⁸ | 8,8x10 ⁸ | 5,6 | 9,7x10 ⁸ | 7,3 | |
| 472 | 9 | 7 | | 9 | | 9 | 7 | | 10 | | |
| | 1,3x10 ⁸ | 1,2x10 ⁸ | 25,7 | 6,8x10 ⁶ | 39,4 | 5,6x10 ⁸ | 8,8x10 ⁸ | 27,1 | 2,3x10 ⁸ | 47,4 | |

* ND = NÃO DETECTÁVEL

FIGURA 1
PADRÕES DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *S. AUREUS*
UTILIZANDO-SE MEIO TEL, pH 7.0 E A 37° C

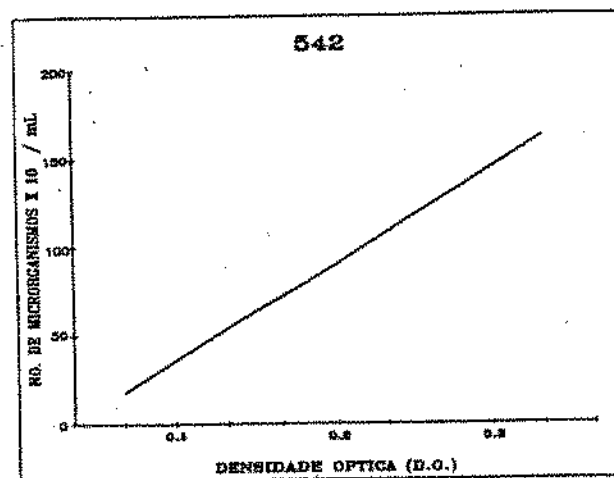
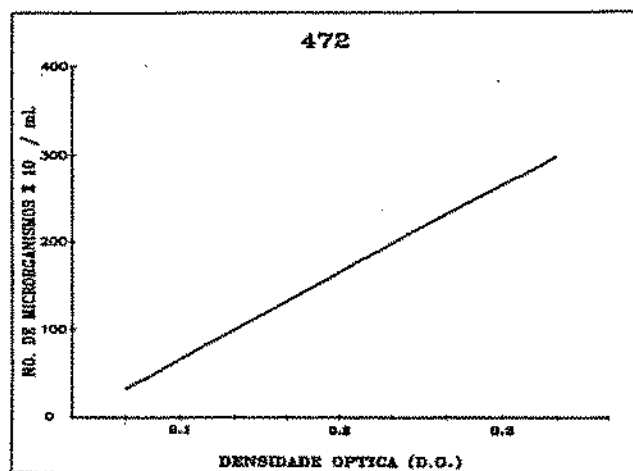
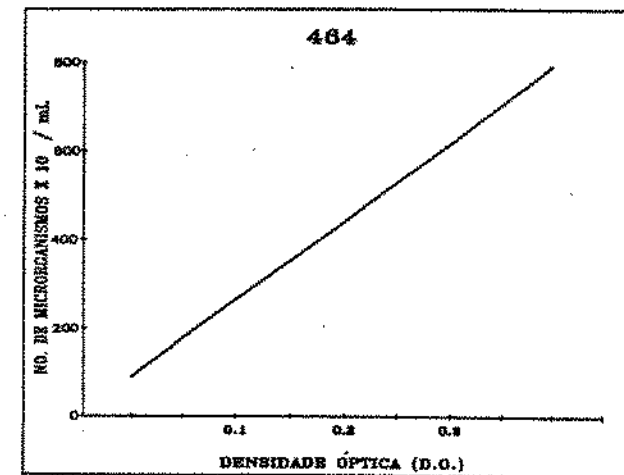
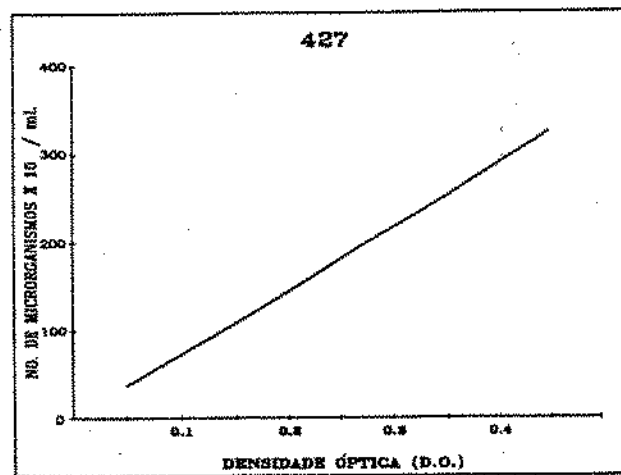
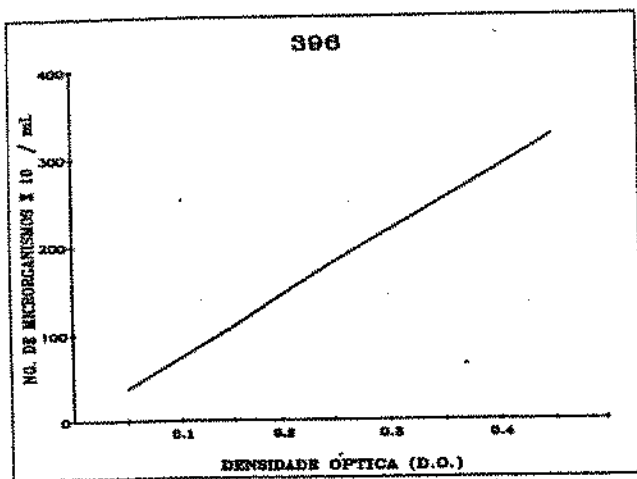


FIGURA 2
CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *S. AUREUS* EM FRASCOS
DE MEIO TEL SOB AGITAÇÃO DE 250 RPM A 37° C

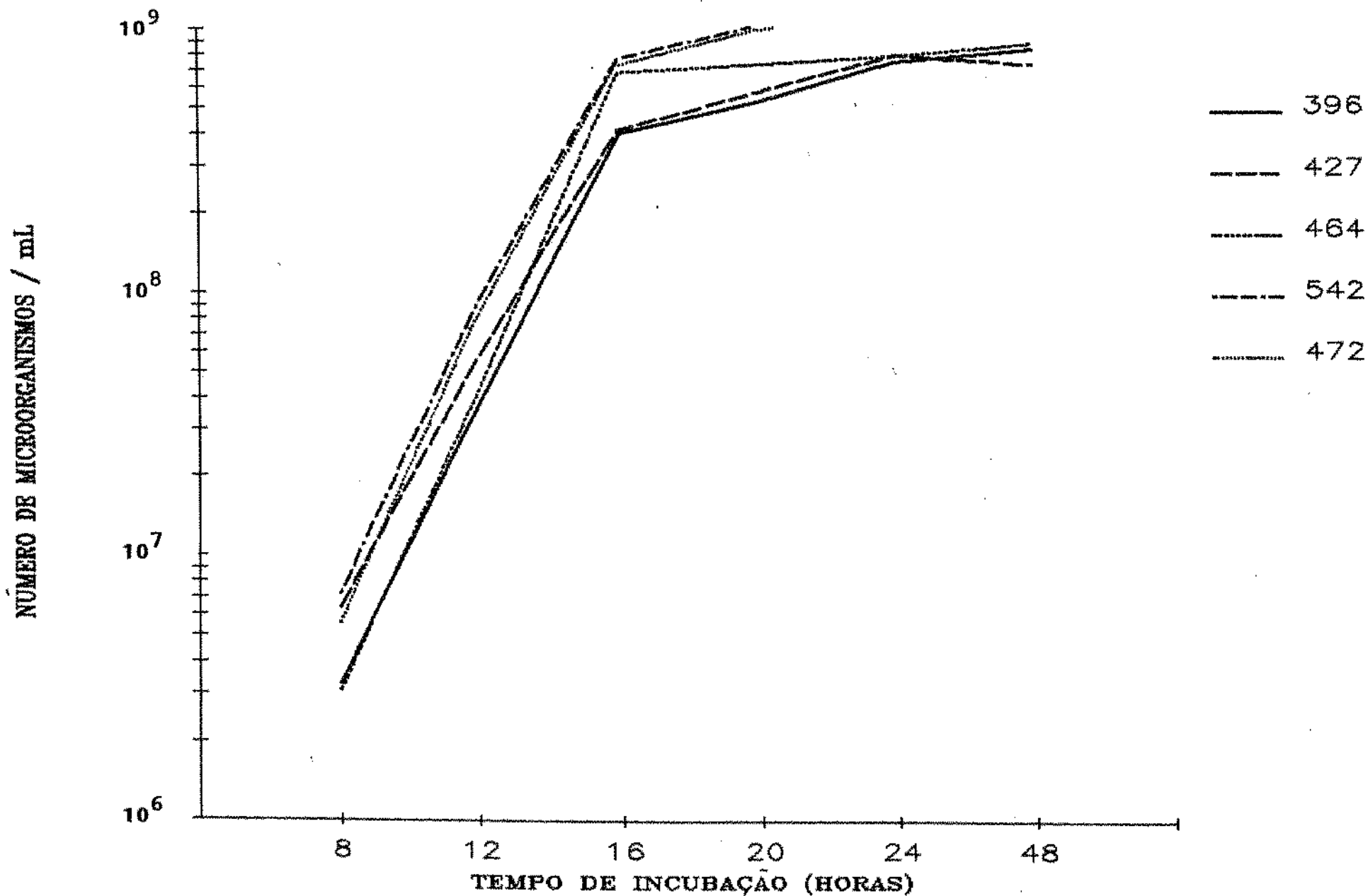


FIGURA 3
CURVA PADRÃO PARA ENTEROTOXINA D UTILIZANDO-SE COMO
DILUENTES MEIO TEL E SOBRENADANTES DE EXTRATOS DE
CREME E PRESUNTO COZIDO

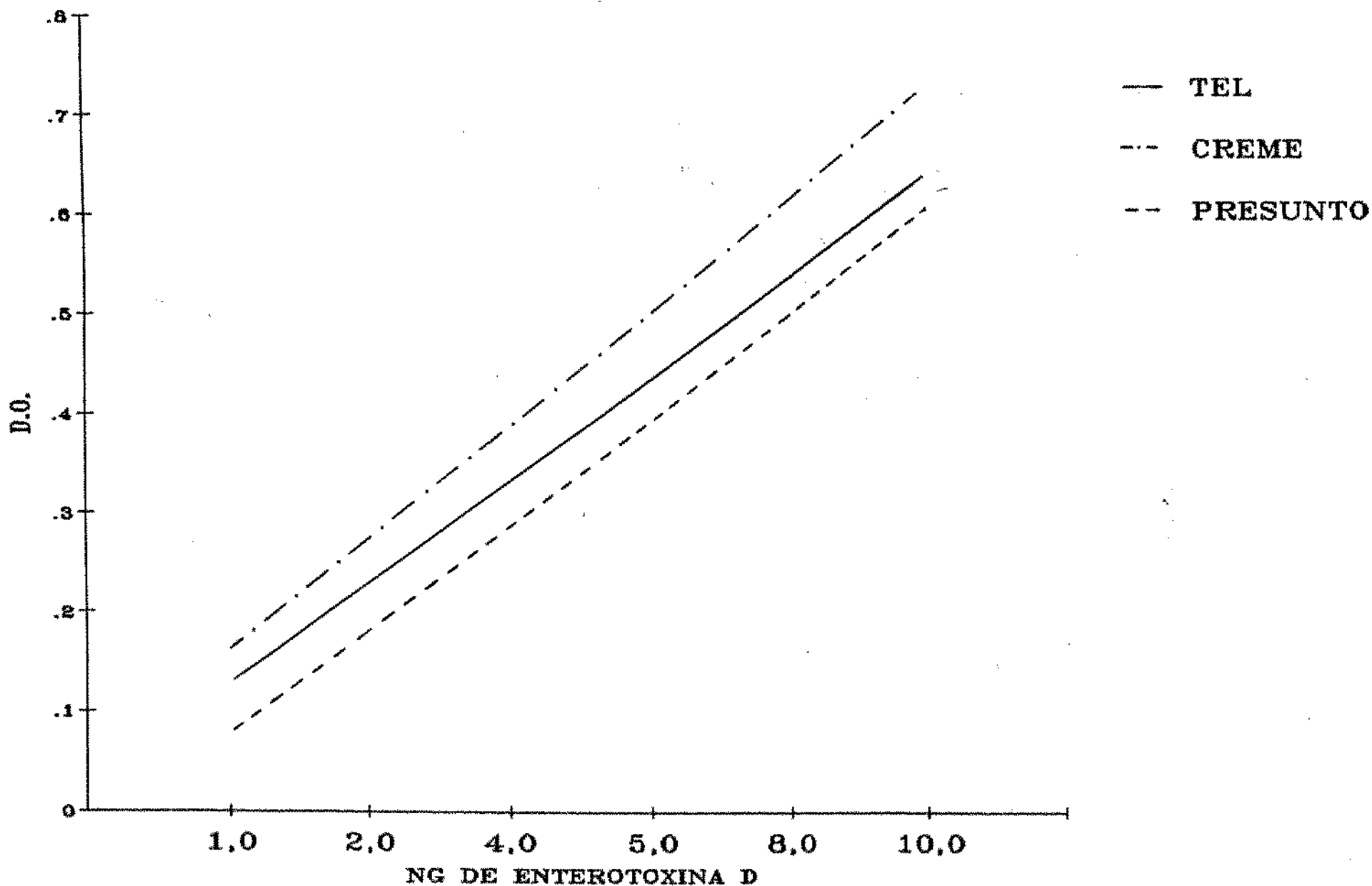


FIGURA 4
PRODUCAO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCOCCICA D EM FRASCOS
DE MEIO TEL SOB AGITACAO DE 250 RPM A 37' C

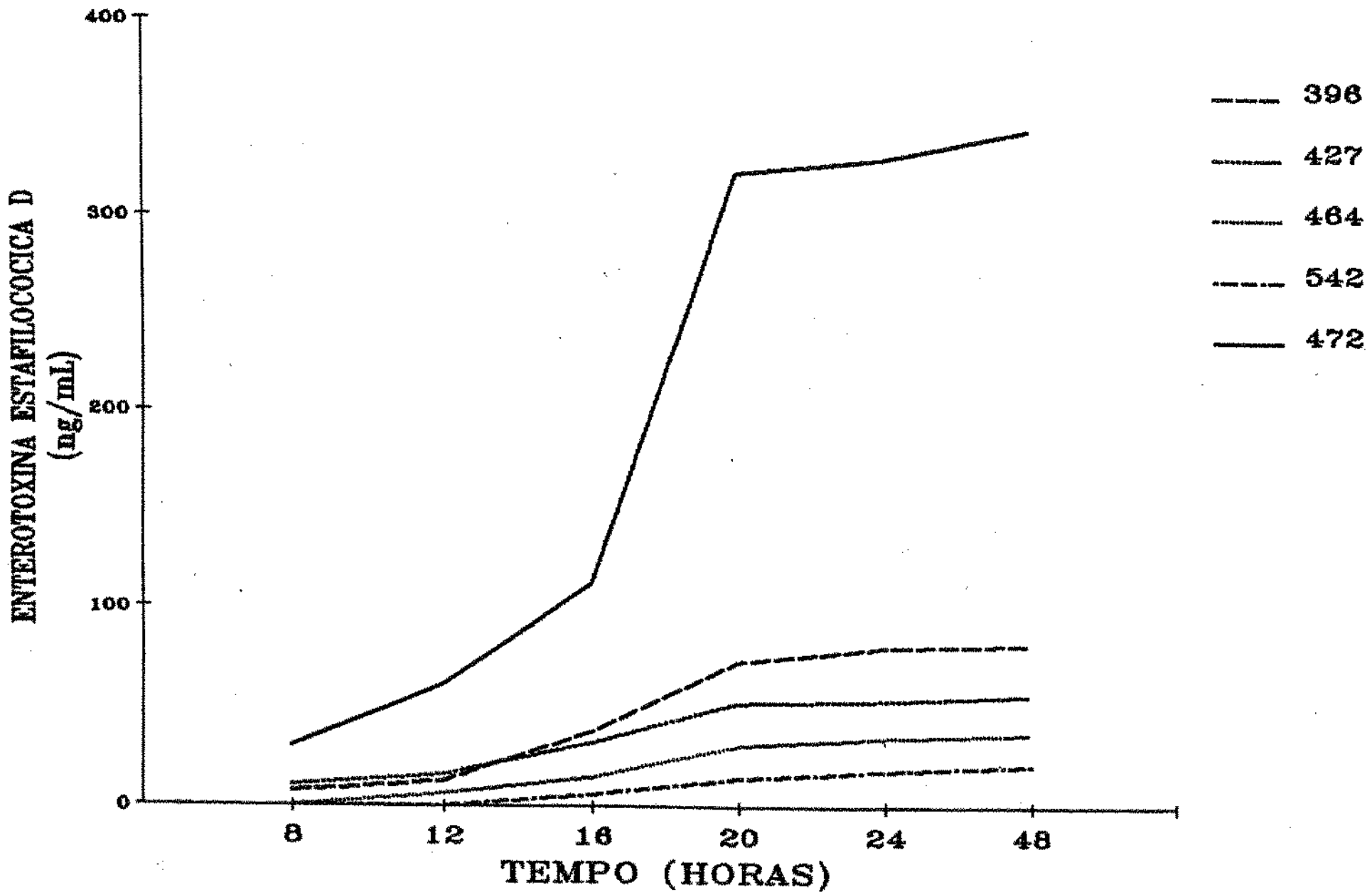


FIGURA 5
PRODUCAO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCOCICA D EM CULTURAS
OBTIDAS PELO METODO DE SACO DE DIALISE EM MEIO TEL,
SOB AGITACAO DE 250 RPM A 37° C

