

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Provas

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Mariko Ueno e apro-
vada pela Comissão Examinadora em 27.07.87.

Campinas, 27 de julho de 1987.



Presidente da Banca

ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA TIPO B: PRODUÇÃO,
PURIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DE ANTI-SORO

MARIKO UENO

Engenheira de Alimentos

09/87

Profa. Dra. Sonia P.C. Salzberg

orientadora

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Sonia P.C. Salzberg, pela amizade e orientação.

A Profa. Dra. Elisa Y. Hirooka, pelas informações iniciais a respeito de análises sorológicas empregadas neste trabalho.

A Profa. Dra. Pilar R. Massaguer, por facilitar o acesso ao uso de microcomputador.

Ao Luis Antônio Aguiar, pelas fotografias.

Aos amigos Denise, Ilse, Neusely, José Luis, Sidney e Jaqueline pelo apoio constante.

A Sra. Esmeralda, por cuidar dos animais durante o trabalho.

A Jardete, Cícera e Marcos da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, pelos serviços prestados.

A todos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A ABIA pelo fornecimento das cópias xerox.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A autora agradece sinceramente:

Ao Sr. Manoel Bernardo da Silva do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP e à Rosa Maria Andrasso Tosello do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que foram imprescindíveis na realização deste trabalho.

Ao Dr. Merlin S. Bergdoll do Food Research Institute, por fornecer gentilmente enterotoxina e anti-soro padrões; assim como pelas valiosas discussões sobre a presente pesquisa.

Aos meus pais

e irmãos

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi a produção, purificação e obtenção de anti-soro da enterotoxina estafilocócica tipo B (EEB). Com os reagentes obtidos (antígeno e anticorpo) procedeu-se ao levantamento de *S. aureus* produtores de enterotoxina B em portadores assintomáticos. A enterotoxina foi produzida pela linhagem *S. aureus* S-6, conhecida como altamente produtora de EEB. O método de purificação foi o de SCHANTZ e colaboradores, e para a produção de anti-soro, utilizou-se o esquema de imunização de coelhos, otimizado pelo Food Research Institute (FRI), Wisconsin, USA. O processo de purificação foi avaliado pela difusão dupla em gel "Optimal Sensitivity Plate", OSP (Ouchterlony modificado) para a identificação da toxina, o método de difusão simples em gel de "Oudin" para a dosagem da toxina, e a dosagem de proteína total foi realizada pelo método de Lowry. Na produção de toxina foi utilizado como meio de cultura o hidrolisado de caseína N-Z-Amine NAK suplementado com tiamina (0,00005%) e niacina (0,001%). A quantidade de toxina produzida neste meio foi de 0,33mg/mL. Na primeira cromatografia em Amberlite CG-50 obteve-se um rendimento de 79,9% em relação à quantidade total adsorvida, na segunda cromatografia em Amberlite CG-50 obteve-se um rendimento de 73,3% em relação à primeira cromatografia e na terceira cromatografia em carboximetil celulose o rendimento foi

de 80% em relação à segunda cromatografia. O rendimento através de todo o processo de purificação, ou seja toxina total produzida no meio de cultura e toxina total após a terceira cromatografia foi de 44,2%. A toxina purificada apresentou um alto grau de pureza já que houve formação de apenas uma linha de precipitação quando ensaiada contra anti-soro polivalente. Para a produção de anti-soro utilizou-se um lote de cinco coelhos, sendo um inoculado com toxina bruta, sem purificar e quatro com toxina purificada. Para a inoculação seguiu-se o esquema de imunização utilizado no FRI, que abrange um período de 70 dias e doses compreendidas entre 1 e 300 µg administradas em oito seções. O soro foi retirado entre uma e oito semanas após a última injeção através de punção cardíaca. O soro do animal imunizado com preparação bruta de enterotoxina apresentou, através do método de DSP, maior variedade de anticorpos, evidenciados através das linhas de precipitação formadas, que os soros dos animais inoculados com enterotoxina purificada. Estes últimos apresentaram ainda alguns interferentes, porém as linhas de precipitação correspondentes foram tênues em relação à linha principal de enterotoxina B. O número de portadores humanos assintomáticos de *S. aureus* 53% está dentro dos valores apresentados na literatura, 18 a 82%. O valor encontrado para as linhagens produtoras de enterotoxina B, 70,8%, foi ligeiramente superior aos valores apresentados na literatura norte americana.

SUMMARY

The principal goal of this work was the production, purification and antiserum production of Staphylococcal enterotoxin B (SEB). With these reagents, antigen and antiserum, a survey of enterotoxin B producing *S. aureus* strains in asymptomatic carriers was conducted. The enterotoxin was produced by the S-6 strain of *S. aureus*, a well known enterotoxin B producer. The purification procedure was that of SCHANTZ and co-workers and for the antiserum production, the Food Research Institute (FRI), Wisconsin, USA immunization schedule was followed. The purification procedure was monitored through the Lowry method for total protein, double diffusion in gel Optimal Sensitivity Plate, OSP (a double diffusion Duchterlony modification) for toxin identification and single gel diffusion of Oudin for toxin quantification. The casein hydrolysate N-Z-Amine NAK supplemented with thiamine (0,00005%) and niacin (0,001%) was used for toxin production. The enterotoxin concentration in the supernatant was 0,33mg/mL. The toxin yield in the first chromatography using the resin Amberlite CG-50 was 79,9% of the total adsorbed in the resin. In the second chromatography, using the same resin, the yield was 73,3% with respect to the first chromatography and in the third chromatography, using Carboximethyl Celullose, the yield was 80% with respect to the second chromatography. The yield for the

entire purification procedure, total toxin after the third chromatography and total toxin in the broth culture, was 44,2%. The purified enterotoxin showed high purity since only one precipitin line was formed against polyvalent antiserum. Five animals were used for the antiserum production, one inoculated with the crude toxin and four with the purified toxin. For inoculation, the FRI recommended schedule was used, with doses ranging between 1 and 300 µg given in eight different sections during a 70 day period. The animals were bled through cardiac puncture after one to eight weeks following the last injection. The antisera obtained from the crude extract immunized animals showed higher number of antibodies, by the OSP method as displayed through precipitin lines, than the antisera from rabbits inoculated with the purified toxin, the latter showed a few very weak secondary lines related to the main line due to enterotoxin B. The number of *S. aureus* asymptomatic carriers 53% was within the range of values found in the literature, between 18 to 82%. Among them, the number of enterotoxin B producers 70,8% was slightly higher than the 68% reported by North American literature.

ÍNDICE

Assunto	Página
Resumo.....	1
Summary.....	3
Índice.....	5
Índice das tabelas.....	9
Índice das figuras.....	10
I. Introdução.....	13
II. Revisão Bibliográfica.....	16
II.1. Histórico.....	16
II.2. Taxonomia.....	17
II.3. Propriedades fisiológicas e bioquímicas.....	18
II.4. Caracterização da enterotoxigenicidade.....	19
II.5. Incidência de <i>S.aureus</i> enterotoxigênicos.....	20
II.6. Enterotoxinas estafilocócicas.....	22
II.7. Estabilidade das enterotoxinas.....	23
II.8. Produção de enterotoxinas.....	25
II.9. Purificação de enterotoxinas.....	30
II.10. Análise de enterotoxinas.....	33
II.11. Imunização.....	38

III. Material.....	39
III.1. Organismos.....	39
III.2. Meios de cultura.....	39
III.3. Reagentes para testes bioquímicos caracte- rísticos da espécie.....	39
III.4. Reagentes para determinação de proteína.....	40
III.5. Material para determinação de enterotoxina estafilocócica tipo B.....	40
III.6. Material para purificação de enterotoxina estafilocócica tipo B.....	41
III.7. Material para imunização e sangria.....	41
III.8. Equipamentos especiais.....	42
IV. Métodos.....	43
IV.1. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em humanos..	43
IV.2. Teste de produção de coagulase.....	43
IV.3. Teste de produção das desoxirribonucleases termo-sensível e termo-resistente.....	44
IV.4. Produção de enterotoxinas	45
IV.4.1. Produção de enterotoxina para análises.....	45
IV.4.1. Produção de enterotoxina para purificação..	46
IV.5. Método de "Optimal Sensitivity Plate".....	47
IV.6. Método de "Dudin".....	48
IV.6.1. Preparo do agar.....	48
IV.6.2. Revestimento dos tubos.....	48
IV.6.3. Preparo do agar-soro.....	49
IV.6.4. Preparo das soluções de antígeno.....	49

IV.6.5. Leituras das bandas de precipitação e construção da curva padrão.....	49
IV.7. Método de Lowry para determinação de proteína...	50
IV.7.1. Reagentes.....	50
IV.7.2. Construção da curva padrão.....	50
IV.8. Purificação da enterotoxina B.....	51
IV.8.1. Tratamento da resina para a primeira cromatografia.....	51
IV.8.2. Primeira cromatografia.....	52
IV.8.3. Diálise.....	52
IV.8.4. Concentração.....	52
IV.8.5. Tratamento da resina para a segunda cromatografia.....	53
IV.8.6. Segunda cromatografia.....	53
IV.8.7. Tratamento da resina para a terceira cromatografia.....	53
IV.8.8. Terceira cromatografia.....	54
IV.8.9. Análise da pureza.....	54
IV.9. Produção de anti-soro para enterotoxina estafilocócica tipo B.....	54
IV.9.1. Imunização.....	55
IV.9.2. Análise do soro.....	56
IV.9.2.1. Determinação do título do soro.....	56
IV.9.2.1.1. Preparo do agar e restimento dos tubos.....	56
IV.9.2.1.2. Preparo do agar-soro.....	56
IV.9.2.1.3. Preparo do antígeno.....	57

IV.9.2.1.4. Leituras das bandas de precipitação e construção das curvas....	57
IV.9.2.2. Análise da presença de anticorpos contra outras proteínas de <i>S. aureus</i>	58
V. Resultados e Discussão.....	59
V.1. Levantamento de <i>S. aureus</i> em humanos.....	59
V.2. Purificação de enterotoxina estafilocócica tipo B.....	59
V.3. Produção de anti-soro para enterotoxina estafilocócica tipo B.....	61
VI. Conclusões.....	63
VII. Bibliografia.....	66

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Leitura da densidade ótica das frações da primeira cromatografia a 277 nm.....	85
Tabela 2. Concentração de proteína e enterotoxina B nas frações da primeira cromatografia.....	86
Tabela 3. Leitura da densidade ótica das frações da segunda cromatografia a 277 nm.....	87
Tabela 4. Concentração de proteína e enterotoxina B nas frações da segunda cromatografia.....	88
Tabela 5. Leitura da densidade ótica das frações da terceira cromatografia a 277 nm.....	89
Tabela 6. Concentração de proteína e enterotoxina B nas frações da terceira cromatografia.....	90
Tabela 7. Quadro geral das etapas de purificação.....	91
Tabela 8. Esquema de imunização.....	92
Tabela 9. Peso dos animais durante a imunização.....	93
Tabela 10. Títulos dos soros em diferentes dias após a última injeção.....	94

ÍNDICE DAS FIGURAS

- Figura 1. Concentração de proteína total e enterotoxina estafilocócica tipo B, para as frações da primeira cromatografia em Amberlite CG-50.....95
- Figura 2. Concentração de proteína total e enterotoxina estafilocócica tipo B, para as frações da segunda cromatografia em Amberlite CG-50.....96
- Figura 3. Concentração de proteína total e enterotoxina estafilocócica tipo B, para as frações da terceira cromatografia em Carboximetil celulose.....97
- Figura 4. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal N^o 1, em diferentes dias após a última injeção.....98
- Figura 5. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal N^o 2, em diferentes dias após a última injeção.....99

Figura 6.	Curvas para determinação dos títulos do soro do animal Nº 3, em diferentes dias após a última injeção.....	100
Figura 7.	Curvas para determinação dos títulos do soro do animal Nº 4, em diferentes dias após a última injeção.....	101
Figura 8.	Curvas para determinação dos títulos do soro do animal Nº 5, em diferentes dias após a última injeção.....	102
Figura 9.	Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 3 contra sobrenadante da cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> S-6 em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes..	103
Figura 10.	Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 5 contra sobrenadante da cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> S-6 em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes..	104
Figura 11.	Dupla difusão em gel dos soros dos animais Nº 3 e Nº 5 contra sobrenadante da cultura de <i>S. aureus</i> S-6 em N-Z-Amine NAK.....	105

Figura 12. Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 3
contra sobrenadante da cultura de *S. aureus* S-184
em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes.....106

Figura 13. Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 5
contra sobrenadante da cultura de *S. aureus* S-184
em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes.....107

Figura 14. Dupla difusão em gel dos soros dos animais Nº 3 e
Nº 5 contra sobrenadante da cultura de *S. aureus*
S-184 em N-Z-Amine NAK.....108

I. INTRODUÇÃO

O estudo de enterotoxinas estafilocócicas é relevante, para a efetiva determinação das condições higiênicas dos alimentos susceptíveis ao desenvolvimento de *Staphylococcus enterotoxigênicos*. Na medida em que a indústria de alimentos se desenvolve, o controle direto das enterotoxinas se faz imprescindível. Os métodos de determinação de coagulase e termonuclease comumente utilizados, indicam apenas uma probabilidade da existência destas enterotoxinas. Por outro lado, na presença de um surto, é imprescindível a determinação direta da enterotoxina ou enterotoxinas envolvidas.

A comprovação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar é apenas uma evidência circunstancial de que o agente etiológico foi encontrado. Até mesmo a determinação de que a cepa isolada é capaz de produzir uma ou mais enterotoxinas não é prova conclusiva de que a cepa em questão produziu esta(s) toxina(s) no alimento. Outra limitação seria a ausência de microrganismo ainda persistindo a toxina devido à sua maior resistência a fatores ambientais adversos. Desta forma, a prova definitiva de que o alimento contém enterotoxina consiste num processo de extração seguido de identificação através de ensaios sorológicos e/ou biológicos. Os ensaios sorológicos são os mais utilizados, e consistem na identificação da toxina ou toxinas através de uma

reação antígeno-anticorpo. A limitação destes ensaios reside na impossibilidade de se detectar novas toxinas por estes procedimentos. Já os ensaios biológicos, sendo que o mais utilizado consiste na introdução do extrato toxigênico através de sonda no trato digestivo de macacos *Rhesus*, e ocasionalmente a utilização de voluntários humanos, permite a detecção de novas toxinas que apresentariam reação negativa nos ensaios sorológicos.

A intoxicação por enterotoxinas estafilocócicas tem sido reconhecida como uma das principais causas de envenenamento alimentar (15,68,101). Durante o período compreendido entre 1975- 1979, 540 surtos de intoxicação alimentar foram comunicados ao "Center of Disease Control" nos Estados Unidos, sendo que 28% dos mesmos foram causados por *Staphylococcus aureus* (101).

Os surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas apresentam-se isolados, geralmente envolvendo grupos de pessoas em refeições coletivas. A maior parte são produzidos pela ingestão de alimentos cárneos, assim como cremes e maionese contaminados (69,70,71,101).

A fonte mais importante de contaminação é o próprio homem, seja através de portadores assintomáticos, grande parte da população apresenta o microrganismo no trato respiratório superior, ou através de feridas infeccionadas, abscessos, furunculoses, etc. Desta forma, manipuladores de alimentos podem facilmente contaminar ingredientes, equipamentos, etc. (2).

Uma vez ingerido o alimento contaminado com enterotoxina, aparecerão sinais de intoxicação, após um período médio de incubação de quatro horas, com predominância de vômitos e náuseas.

seas, as vezes seguidos de diarreia e febre (11).

As enterotoxinas estafilocócicas são exoproteínas produzidas por certas linhagens de *Staphylococcus aureus* (13). Quando os estafilococos enterotoxigênicos contaminam um alimento no qual existem condições adequadas ao seu desenvolvimento, ocorre a produção de uma ou mais enterotoxinas. Estas enterotoxinas, das quais cinco já foram identificadas sorologicamente, são denominadas por letras maiúsculas A, B, C, D e E; sendo que a enterotoxina C existe em duas formas: C1 e C2 (13).

As enterotoxinas se caracterizam pela alta resistência ao calor, não sendo geralmente destruídas pelo tratamento térmico durante o processamento de alimentos, não ocorrendo o mesmo com os estafilococos, que são facilmente destruídos (101). Como consequência, apenas a enterotoxina poderá ser encontrada, mesmo que os microrganismos que a produziram não mais existirem.

Atualmente, nos trabalhos desenvolvidos no Brasil, nesta área, utilizam-se enterotoxinas e anti-soros padrões fornecidos pelo Food Research Institute através do Dr. Merlin S. Bergdoll.

O presente trabalho teve como proposta principal a produção e purificação de enterotoxina B e obtenção de anti-soro, reagentes necessários para a realização de ensaios sorológicos de análises de amostras toxigênicas.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Histórico

O primeiro surto de intoxicação por estafilococos, de que se tem conhecimento, ocorreu em 1884; o mesmo ano em que ROSEMBACH descreveu as espécies tipos do gênero *Staphylococcus* (97). Neste surto, 300 casos de graves distúrbios gastro-intestinais foram documentados no estado de Michigan (EUA), e foram atribuídos ao consumo de queijo tipo "Cheddar". O exame microscópico do queijo revelou a presença de uma bactéria esférica (72).

A primeira demonstração experimental de que a intoxicação alimentar poderia ter sido causada por estafilococos ocorreu em 1914, quando BARBER verificou sintomas típicos de intoxicação alimentar após a ingestão de leite contaminado com *Staphylococcus*, obtido de gado com mastite (104). Porém a importância deste trabalho somente foi reconhecida após 1930, quando DACK e seus colaboradores, trabalhando na Universidade de Chicago, tiveram náusea e diarreia após a ingestão de filtrado estéril de cultura de estafilococos. O microrganismo havia sido isolado de creme de um bolo envolvido em intoxicação (103).

11.2. Taxonomia

A palavra *Staphylococcus* deriva-se do grego *Staphyle* (cachos de uva) e *coccus* (grão, semente). O gênero *Staphylococcus* portanto descreve cachos irregulares de células esféricas que estes microrganismos podem formar em meio de cultura (as células podem também ocorrer isoladas, em pares ou tétrades).

O Manual do Bergey de Bacteriologia Sistemática (97) inclui os gêneros *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* e *Staphylococcus* na família *Micrococcaceae*. As características diferenciais destes gêneros são baseadas em: presença de cápsula, motilidade, fermentação anaeróbica da glucose, testes de oxidase e benzidina, resistência à lisostafina, presença de glucose no peptidoglicano, presença de ácido teichóico na parede celular e conteúdo de C + G (citosina + guanina) do DNA.

As dezenove espécies de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii* subsp.1, *S. cohnii* subsp.2, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. carnosus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* subsp. *hyicus*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *S. caseolyticus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. gallinarum* e *S. caprae*) são diferenciadas com base na produção de pigmentos carotenóides, presença de citocromo C, formação dos isômeros D ou L ácido láctico, produção de acetoina, formação de ácido a partir de diversos carboidratos, redução de nitrato, presença de: urease, fosfatase alcalina, arginina dehidrolase, coagulase, termonuclease e resistência à Novobiocina.

11.3. Propriedades fisiológicas e bioquímicas

Os estafilococos são microrganismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase fortemente positivos, não móteis, não fotossintéticos e não formadores de esporos. Os cocos tem geralmente 0,8 a 1,0 μm de diâmetro; o crescimento em cachos é o resultado de divisões irregulares em dois planos perpendiculares.

Muitas linhagens produzem pigmentos amarelos ou alaranjados, particularmente em meios contendo cloreto de sódio. A maioria das linhagens forma acetona 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 (72).

A positividade dos ensaios de coagulase e DNase serve para identificar uma linhagem de estafilococo como *Staphylococcus aureus*. Também os ensaios de hemolisinas em sangue de algumas espécies de animais como o carneiro permite a identificação de *S. aureus* (25).

Os estafilococos são mesófilos, crescendo melhor em condições aeróbias. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, podendo crescer entre 10 e 45°C (72).

Em meios de composição definida os membros deste gênero necessitam de aminoácidos como fonte de nitrogênio e algumas vitaminas como cofatores de crescimento, em meios de composição definida (21). Crescem bem em meios complexos como o "Brain Heart Infusion" e hidrolisados protéicos.

A maioria das linhagens cresce e se desenvolve na presença de sais, até 15% de NaCl (50). 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 (108).

Um dos meios de isolamento mais amplamente utilizado é o de Baird-Parker (2,108). Consiste de um meio base de agar, acrescido de gema de ovo e agentes inibidores e seletivos.

II.4. Caracterização da enterotoxigenicidade

Muitas características bioquímicas de culturas de estafilococos, são tidas como indicadores de sua enterotoxigenicidade, mas nenhuma característica ou combinação de características é absolutamente segura como indicadora 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, suíno ou humano. Estudos realizados mostram uma alta correlação entre a presença de enterotoxina e da enzima coagulase, porém, existem algumas linhagens toxigênicas coagulase negativa (10,80).

LACHICA et al. (59), sugeriram a presença de desoxirribonuclease termo-estável como indicador de enterotoxigenicidade.

Outra característica de *S. aureus* proposta como indicadora de enterotoxigenicidade é a produção de proteína A, uma vez que 98% das linhagens de estafilococos coagulase positiva, produzem esta proteína (28).

Atividade proteolítica e lipolítica, produção de fosfatase, redução de nitrato, fermentação de carboidratos e sensibilidade a antibióticos não tem aparente relação com produção de coagulase e enterotoxina (72).

11.5. Incidência de Staphylococcus aureus enterotoxigênicos

É bem conhecida a participação de portadores de *Staphylococcus aureus* na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica. A colonização nasal do *S. aureus* no homem é descrita frequentemente e uma grande proporção de pessoas sadias mantém este microrganismo em suas fossas nasais, constituindo-se em seu maior reservatório. Aproximadamente 30 a 50% dos adultos são portadores (93).

Estudos realizados com manipuladores de alimentos em hospitais, mostraram que 35,3% (49), 30% (62) e 18,2% (37), são portadores de *S. aureus*.

HENNING et al. (42), encontraram que 32% e 30% da população hospitalar tem *S. aureus* nas fossas nasais e na garganta

respectivamente. HARTWELL et al. (41), encontraram uma porcentagem de 10,2% para portadores de *S. aureus*. REALI (87) relatou que 82% das linhagens de *S. aureus* isoladas de pessoas sadias e de pessoas com alguma infecção eram capazes de produzir enterotoxina A, B ou ambas, com predominância (68%) para produtores de enterotoxina B; por outro lado WIENEKE (115), encontrou que 38% de pessoas sadias e 45% de pessoas com lesões apresentavam cepas produtoras de enterotoxina A; 42,8% de cepas toxigênicas encontradas em pessoas com alguma infecção apresentavam predominância de enterotoxina C (79).

Levantamentos realizados com alimentos revelaram algumas discrepâncias em relação aos dados apresentados por diferentes pesquisadores. Assim 96,2% de linhagens isoladas de alimentos mostraram ser produtoras de enterotoxina de acordo com CASMAN e colaboradores (19). Este valor foi de 92% para SINKOVICOVA & GILBERT (100), 62,5% com predominância de enterotoxina A (47,2%) para PAYNE & WOOD (83), 47% com predominância para enterotoxina B (44%) para REALI (87) e 42,7% em produtos cárneos com predominância para enterotoxina A de acordo com HIROOKA & MULLER (44). ADESIYUN (1), encontrou que 97 (39,1%) das 248 amostras de alimentos prontos para consumo, produziam enterotoxinas, sendo que a enterotoxina D foi encontrada com maior frequência, 44,3%. DELAZARI & LEITAO (24), encontraram que 69,5% de 128 amostras de macarrão revelaram presença de *S. aureus* e destas, 63% foram confirmadas como sendo enterotoxingênicas, com predominância para enterotoxina A (31%).

II.6. Enterotoxinas estafilocócicas

Os estafilococos produzem uma série de proteínas que causam reações enterotóxicas em maçacos. A base para diferenciação destas proteínas, são suas reações com anticorpos específicos (14). Em 1960, CASMAN (16) reportou a existência de dois tipos sorologicamente distintos de enterotoxinas. Uma delas produzida pelo *S. aureus* 196 E, foi designada como tipo "F" (Food Poisoning) e a outra produzida pela linhagem 243, foi designada tipo "E" (Enteritis). Esta nomenclatura foi mudada em 1962 e o tipo F foi chamado de A (16) e o tipo E foi chamado de tipo B (6) e mais tarde foram descobertas outras enterotoxinas denominadas: C (8), D (19), e E (12). Duas enterotoxinas C de diferentes linhagens foram purificadas como C1 e C2 com base nos seus diferentes pontos isoelétricos 8,6 e 7,0, respectivamente (13).

As enterotoxinas são cadeias simples de polipeptídeos que contém alta quantidade de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina (47).

O estudo da sequência de aminoácidos em enterotoxina B revelou a presença de 239 resíduos, com peso molecular de 28.494 (45,46,47), cujo ponto isoelétrico é 8,6 (95). Apenas dois resíduos de cisteína estão presentes, e se localizam aproximadamente no centro da cadeia, nas posições 92 e 112 (47). Uma vez que não há grupos SH livres na enterotoxina B, as duas meia cistina estão unidas em um resíduo de cisteína (13).

A enterotoxina A, isolada ou em combinação com outras

enterotoxinas, tem sido encontrada em aproximadamente 75% dos surtos de intoxicação (19). A enterotoxina B foi encontrada em poucos casos, entretanto tem sido melhor estudada por se conseguir produzir em altas concentrações em meios de laboratório (88).

Uma dose de 20 a 25 μ g de enterotoxina B poderia produzir manifestação clínica em humanos (84).

Anticorpos para enterotoxina estafilocócica foram encontrados em 85% das pessoas que trabalhavam com enterotoxinas, em laboratórios; por outro lado, 23% de um grupo controle possuíam anticorpos específicos para enterotoxina (57)

II.7. Estabilidade das enterotoxinas

As enterotoxinas no estado ativo são resistentes às enzimas proteolíticas como a tripsina, quimotripsina, renina e papaína (13).

A atividade biológica das enterotoxinas estafilocócicas exibe alta resistência térmica. O aquecimento a 100°C por 30 minutos a pH 6,0 e 7,5, mostaram uma inativação de 95% através de ensaio em macacos (105).

Houve diminuição de 50% na atividade da enterotoxina B quando aquecida a 100°C por 5 minutos (95).

O valor Z para a enterotoxina B é maior que para a enterotoxina A, indicando que a primeira é mais resistente ao aquecimento que a última. READ & BRADSHAW (85), determinaram o valor Z de 46-50F para enterotoxina A e 52-58F para enterotoxina B.

JAMLANG et al. (51) e SATTERLEE & KRAFT (92) encontraram que a enterotoxina B perde atividade mais rapidamente a 80°C do que a 100°C, nos trinta minutos iniciais de inativação.

O tratamento térmico das enterotoxinas B e C a 100 e 121°C inativou completamente as toxinas em 3 horas e 30 minutos, respectivamente, e a inativação foi mais rápida a 80°C que a 100°C durante o período inicial (10-30 minutos). Após este período resultou mais rápida inativação a 100°C (33).

A enterotoxina C é mais resistente ao calor que a enterotoxina B. A enterotoxina C tratada a 80°C por 10 minutos, teve reativação de 100% após 24 horas de incubação a 25°C. A inativação realizada com agitação não permitiu a reativação (33).

A enterotoxina A foi inativada mais rapidamente a pH 5,5 que a pH 6,5 ou maior. Por outro lado, a enterotoxina D foi inativada mais rapidamente a pH 6,5 do que à pH 5,5 (107).

READ & BRADSHAW (86), estudaram a inativação da enterotoxina B, por radiação γ e determinaram que era necessário uma dose de 5 Mrad para reduzir a concentração de enterotoxina B de 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão Veronal para 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Quando o veículo usado foi leite, foram necessários 20 Mrad para reduzir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O valor D (dose para inativar 90%) utilizando tampão veronal e leite foram 2,7 e 9,7 Mrad, respectivamente.

II.8. Produção de enterotoxinas

Em 1963, CASMAN & BENNETT (17), descreveram que o caldo de coração e cérebro (BHI) se constituía no melhor meio para produção de alta quantidade de enterotoxina. O meio utilizado para estudo de produção de enterotoxina tem sido o caldo BHI ou um caldo com algum tipo de caseína hidrolisada como principal ingrediente (11,105).

Digeridos pancreáticos de caseína têm sido utilizados para produção em larga escala, porque são compostos de substâncias de baixo peso molecular que são facilmente elimináveis na purificação de enterotoxinas, e o mesmo é superior ao BHI para produção de pequenos volumes com alta concentração de enterotoxina.

De acordo com estudos realizados por SURGALLA, em 1947 (104) a enterotoxina foi detectada em sobrenadante de cultura em meio contendo de 2 a 16 aminoácidos como fonte de nitrogênio. O meio mais simples, utilizado com sucesso, para produção de enterotoxina continha apenas arginina e cistina.

A quantidade de enterotoxina B produzida em meio definido foi de, aproximadamente, 1/7 da produção em meio complexo, apesar do crescimento ter sido similar ao meio complexo (63).

Estudos realizados por WU & BERGDOLL (116), mostraram que relativamente grande quantidade (125 mg/mL) de enterotoxina B era produzida em meio sintético contendo aminoácidos, sais inorgânicos e vitaminas.

Devido ao fato de que o meio de hidrolisado protéico, N-Z-Amine NAK deixou de ser produzido, foi proposto o uso de meio contendo 4% de triptona e 1% de extrato de levedura para produção de enterotoxinas (65).

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 (64,74). A máxima produção ocorreu durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária (74).

De acordo com MCLEAN e colaboradores a toxina foi detectada pela primeira vez após 5 horas de incubação a 37°C, com a produção aumentando até as 20 horas de incubação, enquanto a cultura entrava em fase estacionária após 7 a 9 horas. Com o abaixamento da temperatura de incubação ocorreu decréscimo na quantidade de toxina sintetizada, sem entretanto afetar o crescimento (64).

MORSE et al. (74) observaram que a enterotoxina B tinha a máxima produção depois de completada a fase exponencial de crescimento e uma correspondente elevação do pH do meio foi observada.

A adição de uma fonte de energia rapidamente metabolizável como glucose ou piruvato ao meio de caseína hidrolisada causou repressão severa na síntese de enterotoxina B. Análises dos produtos finais não gasosos do metabolismo da glucose e piruvato

ao meio de caseína hidrolisada causou repressão severa na síntese de enterotoxina B. Análises dos produtos finais não gasosos do metabolismo da glucose e piruvato mostraram que, condições que favorecem a descarboxilação oxidativa do piruvato favorecem a repressão de síntese de toxina. A eliminação de tiamina do meio de cultura previne a descarboxilação oxidativa do piruvato pelo *S. aureus* S-6 e parcial ou completamente reverte a repressão da glucose e piruvato na síntese de toxina (75).

Os estudos de MORSE e colaboradores (74,75,76,77) levaram a crer que a repressão da síntese de enterotoxina mediada pela glucose estava sob controle catabólico. Entretanto IANDOLO & SHAFER (48), mostraram que a ação da glucose não estava ligada à repressão catabólica, através de experimentos utilizando análogos da glucose. α -Metil glucosídeo teve um efeito estimulatório na produção de enterotoxina e 2-Desoxiglucose inibiu severamente a produção de enterotoxina. As células utilizadas neste estudo eram permeáveis ao 3'-5'-Adenosina Monofosfato (cAMP), porém a adição deste composto não reverteu a repressão da glucose ou do 2-Desoxiglucose na síntese de enterotoxina B. Através destes dados, os autores 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 glucose no meio resulta em abaixamento de pH, devido aos produtos do metabolismo da glucose. MORSE et al. (74), mostraram que menor quantidade de enterotoxina B é produ-

zida na presença de glucose, em parte devido ao decréscimo de pH. A síntese de enterotoxina B aumentava a pH 6,4 ou acima, e era reprimida a pH próximo de 5,0, entretanto maior quantidade de toxina era sintetizada se o meio fosse tamponado a pH acima de 5,6.

O pH ótimo para produção das enterotoxinas A, B e C ocorre na faixa entre 6,5 e 7,3 (54). Segundo METZGER (66) o pH ótimo para produção de enterotoxinas está próximo de 7,0. O pH mínimo para produção de enterotoxina A e B em condições aeróbicas é de 4,9 e 5,1, respectivamente. Porém, em anaerobiose, não produzem enterotoxina detectável a pH abaixo de 5,7 (3). Entretanto GENIGEORGIS *et al.* (37), detectaram produção de enterotoxina em anaerobiose a pH 5,3 e 5,58 em incubação a 30 e 10°C respectivamente.

SCHEUSNER *et al.* (96) observaram que uma quantidade detectável de enterotoxina foi produzida em meio tamponado com pH inicial de 5,15 a 9,02 e a pH inicial de 6,14 a 7,95 em meio não tamponado.

SCHEUSNER *et al.* (96) e TATINI (107) verificaram que 13 e 45°C são as temperaturas mínima e máxima para produção de enterotoxina B, porém GENIGEORGIS *et al.* (37) detectaram enterotoxina B em presunto curado a 10°C após 2 semanas de incubação em anaerobiose com pH acima de 5,6.

Segundo VANDEMBOSH *et al.* (111), a máxima produção de enterotoxina B ocorre com incubação a 40°C.

zida na presença de glucose, em parte devido ao decréscimo de pH. A síntese de enterotoxina B aumentava a pH 6,4 ou acima, e era reprimida a pH próximo de 5,0, entretanto maior quantidade de toxina era sintetizada se o meio fosse tamponado a pH acima de 5,6.

O pH ótimo para produção das enterotoxinas A, B e C ocorre na faixa entre 6,5 e 7,3 (54). Segundo METZGER (66) o pH ótimo para produção de enterotoxinas está próximo de 7,0. O pH mínimo para produção de enterotoxina A e B em condições aeróbicas é de 4,9 e 5,1, respectivamente. Porém, em anaerobiose, não produzem enterotoxina detectável a pH abaixo de 5,7 (3). Entretanto GENIGEORGIS *et al.* (37), detectaram produção de enterotoxina em anaerobiose a pH 5,3 e 5,58 em incubação a 30 e 10°C respectivamente.

SCHEUSNER *et al.* (96) observaram que uma quantidade detectável de enterotoxina foi produzida em meio tamponado com pH inicial de 5,15 a 9,02 e a pH inicial de 6,14 a 7,95 em meio não tamponado.

SCHEUSNER *et al.* (96) e TATINI (107) verificaram que 13 e 45°C são as temperaturas mínima e máxima para produção de enterotoxina B, porém GENIGEORGIS *et al.* (37) detectaram enterotoxina B em presunto curado a 10°C após 2 semanas de incubação em anaerobiose com pH acima de 5,6.

Segundo VANDEMBOSH *et al.* (111), a máxima produção de enterotoxina B ocorre com incubação a 40°C.

A cinética de síntese de toxina foi similar no crescimento aeróbio e anaeróbio. Entretanto, a quantidade de toxina sintetizada anaerobicamente foi 40 vezes menor que a sintetizada aerobicamente (77).

GENIGEORGIS *et al.* (37) estudaram a produção anaeróbica da enterotoxina estafilocócica tipo B em alimentos e observou que um pH baixo era inibitório, não sendo produzida a pH menor que 5,30 a 30°C ou abaixo de 5,58 a 10°C.

Culturas aeradas produziram toxina mais rapidamente e em maior quantidade que culturas estáticas (64).

Para se obter quantidades apreciáveis de enterotoxina, era necessário a aeração da cultura (27,33,64,89). Segundo DIETRICH *et al.* (26), para a linhagem *S. aureus* S-6, produtora de enterotoxina B, a melhor produção ocorreu quando se fez a fermentação à 37°C, sob agitação de 350 rpm.

Uma concentração de 10% de NaCl teve um efeito relativamente pequeno no crescimento da cultura, entretanto uma concentração de 3% de NaCl causou grande decréscimo na produção de toxina (64). Por outro lado, GENIGEORGIS *et al.* (37) detectaram enterotoxina em carne curada com salina na concentração de 9,2%.

TROLLER & STINSON (110) utilizaram glicerol para controlar a atividade de água e encontraram que *S. aureus* produtor de enterotoxina A crescia à $a_w = 0,93$, mas não à $a_w = 0,89$ e que a enterotoxina A era sintetizada à $a_w = 0,95$, mas não à $a_w = 0,93$. Com *S. aureus* produtor de enterotoxina B, houve crescimento à $a_w = 0,91$, mas não à $a_w = 0,89$, e a enterotoxina B era produzida à $a_w = 0,93$ mas não à $a_w = 0,91$.

A adição de K^+ (53,60 μ moles/mL) e NaF (57,14 μ moles/mL) reprimiram completamente a síntese de enterotoxinas. Entretanto a reversão da inibição por adição de Mg^{+2} sugere que o sistema enzimático que controla a síntese de enterotoxinas requer Mg^{+2} . NaF inibe reações enzimáticas pela complexação com Mg^{+2} (31).

Adição de Mg^{+2} (0,4 a 1,5 mM), PO_4^{-3} (1,44 a 2,87 mM) ou K^+ (1,5 a 30 mM) resultou em aumento de 100% na produção de enterotoxina B. Adição de traços de outros metais não afetaram a síntese desta enterotoxina (58).

Para produção em pequena escala e alta concentração foram propostos os métodos de "Sac Culture" (17,27) e o método de "Over Layer Agar" (39,52).

11.9. Purificação de enterotoxinas

A purificação de uma das enterotoxinas era necessário para revelar a exata natureza destes compostos (6). A principal intenção de determinar a natureza das enterotoxinas, era para aplicar estes conhecimentos no desenvolvimento de testes específicos. A determinação de que a enterotoxina B era uma proteína antigenicamente ativa, abriu caminho para o uso de métodos sorológicos.

Uma vez que há várias enterotoxinas e cada uma possui seus próprios anticorpos, é necessário identificar cada uma com seu anticorpo. A absoluta prova de identidade pode ser feita apenas com enterotoxina purificada; então, é essencial a purificação de todas as enterotoxinas (13).

A segunda razão para se obter enterotoxinas purificadas é o estudo de suas estruturas em detalhe e sua relação com antigenicidade e toxicidade.

Uma vez que as enterotoxinas são produzidas em pequenas quantidades, o maior problema era a sua recuperação dos grandes volumes de sobrenadante de cultura. Muitos métodos têm sido testados, mas o mais utilizado para enterotoxina B é a adsorção direta do sobrenadante com resina de troca iônica (7).

A enterotoxina B foi purificada pela primeira vez em 1959 por BERGDOLL, SUGIYAMA e DACK (6) após produção da enterotoxina segundo SURGALLA *et al.* (105). A metodologia de purificação descreve os seguintes passos: (1) precipitação ácida; (2) adsorção em Alumina; (3) precipitação em álcool; (4) adsorção em Amberlite IRC-50 e (5) eletroforese em amido. Este procedimento permitiu obter enterotoxina de alta pureza, isto é, a preparação era homogênea em ultracentrifugação e em eletroforese (44), mostrava apenas um antígeno em difusão em gel e causava sintomas típicos em macacos quando administrada oralmente. Entretanto o rendimento da purificação era menor que 1,0 mg/Litro de cultura. Em 1961 (7) os mesmos autores sugeriram uma modificação utilizando a resina de troca iônica IRC-50 diretamente no sobrenadante de cultura.

FREA et al. (29) propuseram um método que fornecia a recuperação de mais de 4 mg/Litro de cultura. O método incluía os seguintes passos: (1) concentração do sobrenadante de cultura com Polietileno glicol; (2) precipitação com etanol e (3) filtração em Sephadex. A toxina purificada por este método mostrou características semelhantes à purificada por BERGDOLL et al. (6), isto é, comportamento em eletroforese e imunodifusão.

SCHANTZ et al. (95) descreveram um método de purificação em larga escala baseado em procedimentos cromatográficos de troca iônica. Foi utilizada a resina Amberlite CG-50 duas vezes e carboximetil celulose, que resultou em enterotoxina B de alta pureza e com maior rendimento que os procedimentos anteriores. O ponto isoelétrico foi determinado como 8,6. Este método forneceu uma recuperação de 50-60%.

HALLANDER (44), discutiu a respeito da pureza da enterotoxina B conseguida através dos métodos anteriormente citados e propôs uma metodologia de purificação baseada nos seguintes passos, entre outros: (1) concentração e diálise; (2) filtração em Sephadex G-100 e (3) eletroforese em celulose. Seus resultados apresentaram uma toxina mais pura que a dos anteriores e concentrações muito menores foram necessários para dar linha de precipitação em difusão em gel, assim como para causar sintomas de intoxicação em animais. Entretanto não se fez referência quanto à porcentagem de recuperação.

II.10. Análise de enterotoxinas

O uso de macacos *Rhesus* jovens proporciona o melhor bioensaio para as enterotoxinas. É feito pela administração da enterotoxina em solução (mais de 50 mL) para macacos jovens (2 a 3 Kg), através de cateter. Os animais são observados durante 5 horas após a alimentação (22,15).

O custo dos animais, sua manutenção, somados ao fato de que estes animais adquirem resistência às enterotoxinas, são as maiores dificuldades de se utilizar bioensaio (23).

Testes empregando anticorpos específicos têm sido adaptados para a determinação quantitativa e qualitativa da enterotoxina.

Se um determinado antígeno como a enterotoxina, interage com seu anticorpo específico, de título apropriado, há formação de precipitação. Se o antígeno e o anticorpo estão incorporados no agar, o precipitado torna-se visível como uma linha ou banda. Se os reagentes estão separados e ambos se difundem, um em direção ao outro, a técnica é designada de dupla difusão (81). Se o antígeno se difunde em direção ao anticorpo que está imóvel, chama-se simples difusão (82).

OUCHTERLONY (81) desenvolveu a técnica de dupla difusão utilizando placas de Petri comum para suporte do agar. WADSWORTH (112), modificou o procedimento, utilizando lâmina de microscópio com uma fina camada de agar, permitindo o uso de pequenas quantidades de reagentes que eram aplicados na superfície do

sgar com auxílio de um molde com orifícios. Este método foi adaptado para enterotoxinas estafilocócicas em alimentos por CASMAN & BENNETT (18), que envolve tres passos para o preparo da amostra: (1) separação da enterotoxina dos constituintes insolúveis; (2) separação dos extratos solúveis e (3) concentração do extrato e detecção pela técnica de microlâmina ("microslide"). A técnica de microlâmina de CASMAN e BENNETT (18) tem sido utilizada por sua especificidade e sensibilidade.

De acordo com HALL *et al.* (38) o procedimento de simples difusão em gel detecta até 1,0 µg de enterotoxina B por mililitro de extrato de alimento ou filtrado de cultura. WEIRETHER *et al.* (113) adaptaram o método de simples difusão para ensaios mais rápidos.

Em 1969, CASMAN *et al.* (20) apresentaram um trabalho detalhado com o intuito de elucidar publicações contraditórias sobre a performance e sensibilidade da difusão dupla em microlâmina contra simples difusão em tubo, e afirmaram neste trabalho que, com o método de microlâmina poderia-se detectar até 0,1 µg de enterotoxina A e B por mililitro, o que foi posteriormente corroborado por BERGDOLL (14).

TOSHACH *et al.* (109) propuseram algumas modificações no método de microlâmina para leituras após 24 horas de incubação, diminuindo para 1/3 do período de incubação de Casman.

Até 1976, a técnica de microlâmina foi utilizada como método qualitativo. Neste ano FUNG *et al.* (34) propuseram utilizá-lo para quantificar enterotoxina B.

MEYER & PALMIERI (67) propuseram o uso de microlâmina para triagem de grande número de cepas isoladas, utilizando soro polivalente A, B, C, e D. O método assim modificado tem sensibilidade de 0,3 µg/mL.

FUNG & WAGNER (32) descreveram um método de difusão em tubo capilar com sensibilidade para 1 a 2 µg/mL.

ROBBINS *et al.* (90) propuseram o método de "Optimal Sensitivity Plate" (OSP), que é uma modificação da técnica de Ouchterlony (81). A técnica foi desenvolvida para fornecer a máxima sensibilidade possível, sem sacrificar a visualização das linhas de precipitação. Utilizou-se pequenas placas de Petri de 50 mm de diâmetro e um molde de acrílico para perfurar o agar. As vantagens deste método são muitas: é de fácil manipulação e requer pouca habilidade técnica do operador, fácil de preparar, fácil para observar as linhas de precipitação e pode-se guardar as placas por longo período.

Outra técnica para detecção de enterotoxina é o teste de anticorpo fluorescente (36). Anticorpos específicos para uma dada enterotoxina foram conjugados com isotiocianato de fluoresceína. O aparecimento de fluorescência no corpo celular ou perto indica secreção de enterotoxina pelo estafilococo. A sensibilidade é de 0,05 µg/mL e 1,0 µg/mL, segundo GENIGEORGIS & SADLER (36) e BERGDOLL (11), respectivamente.

JOHNSON *et al.* (55) e MORSE & MAH (73) descreveram métodos baseados na técnica de hemaglutinação. No procedimento de MORSE & MAH (73) os eritrócitos de carneiro tratados com formol são posteriormente tratados com ácido tânico e sensibili-

zados com enterotoxina. No método de JOHNSON *et al.* (55) a enterotoxina é acoplada aos eritrócitos com benzidina bisdiatozada. Os eritrócitos sensibilizados em ambos os métodos são adicionados à combinação enterotoxina-antienterotoxina. Se estiver presente suficiente enterotoxina livre (não combinada com anticorpo), ocorre a hemaglutinação. Portanto, os eritrócitos sensibilizados atuam como indicadores da ocorrência ou não da precipitação antígeno-anticorpo.

A hemaglutinação passiva reversa foi descrita por SILVERMAN *et al.* (99), no qual eritrócitos de carneiro preservados em formalina são tratados com ácido tânico antes da sensibilização com antienterotoxina. Soluções de enterotoxina são tratadas com os eritrócitos sensibilizados e o grau de aglutinação é determinado após 2 horas. Concentração de 0,0015 µg/mL tem sido detectada em filtrados tóxicos.

As técnicas acima citadas que utilizaram eritrócitos sensibilizados com ácido tânico, apresentam o inconveniente da dificuldade de se armazenar as células por longo tempo. Ao contrário, células sensibilizadas com glutaraldeído apresentaram maior estabilidade, podendo ser liofilizadas e utilizadas após um ano sem perder a sensibilidade (98).

JOHNSON *et al.* (56) descreveram um método de detecção baseado no ensaio radio imunológico em fase sólida. O imuno ensaio emprega enterotoxina marcada com I^{125} e tubos de poliestireno coberto com anticorpo específico. A enterotoxina não marcada compete com a enterotoxina marcada pelo sítio do anticorpo. O método tem sensibilidade para 1,0 a 5,0 ng/mL.

NIYOMVIT *et al.* (78) desenvolveram um método baseado no ensaio radio imunológico de afinidade. Anticorpo contra enterotoxina B foi ligado covalentemente à Sepharose 4B pela ativação com Brometo de Cianogênio. O gel contendo o anticorpo foi diluído com Sephadex G-25 e 1-2 mL empacotados em uma pequena coluna. A seguir passou-se as seguintes soluções através da coluna: enterotoxina padrão marcada com I^{125} ; enterotoxina a ensaiar; tampão fosfato de Na^+ 0,13M, pH 7,5 contendo NaCl 0,15M e $NH_4 OH$ 0,13M, pH 10,5 contendo NaCl 0,15M. A quantidade de enterotoxina marcada removida da coluna com solução de pH 10,5 era inversamente proporcional à quantidade de enterotoxina na amostra.

SAUNDERS & BARTLET (94) introduziram a técnica de ensaio utilizando enzima ligada (ELISA), que se mostrou simples e sensível. STIFFLER-ROSEMBERG & FUNG (102) propuseram uma modificação onde descreveram o uso de esferas de poliestireno de 6,0 mm de diâmetro cobertas individualmente com anticorpo contra as enterotoxinas, que foram então testadas para enterotoxina pelo método de ELISA competitivo. Uma concentração de 0,1 ng/mL ou menos de enterotoxina pode ser detectado. Neste método a enzima foi acoplada ao anticorpo específico, enquanto no método de SAUNDERS & BARTLET a enzima foi acoplada à enterotoxina.

BERDAL *et al.* (5) propuseram a técnica de ELISA utilizando o método de sanduiche, e placas de microtítulo de polivinil. Este método tem uma sensibilidade de 0,5 ng/mL.

FREED *et al.* (30) utilizaram o método de sanduiche com esferas de poliestireno e placas de microtítulo e concluíram que com o uso das placas o método resulta mais sensível.

11.11. Imunização

SURGALLA *et al.* (106) demonstraram que o soro de coelhos imunizados com enterotoxina bruta formalinizada neutralizava a enterotoxina em preparações parcialmente purificadas. Reações negativas foram obtidas quando preparações da enterotoxina tratadas com o soro foram administrados a macacos *Rhesus*. Esta informação indicava que a resistência à enterotoxina que se desenvolveu nos animais era devida à formação de anticorpos e que era possível a imunização de animais contra a enterotoxina.

BERGDOLL (9) descreveu a imunização de macacos *Rhesus* com enterotoxóide B; a qual foi preparada pelo tratamento com formaldeído e adsorvida em hidróxido de alumínio.

ROBBINS & BERGDOLL (91) propuseram um método de imunização de coelhos, que evoluiu durante os anos de experiência no preparo de anti-soro para enterotoxinas estafilocócicas. O método utilizou quantidades moderadas de enterotoxina para produção de anti-soro de alto título. A metodologia atualmente proposta permite utilizar o mesmo procedimento para todas as enterotoxinas conhecidas (anteriormente utilizavam-se diferentes procedimentos para as diferentes toxinas) simplificando assim a aplicação do método. De acordo com esta técnica, os coelhos são imunizados através de injeções subcutâneas, inoculando-se um total de aproximadamente 0,5 mg de enterotoxina previamente diluída em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4, junto com adjuvante de Freund completo nas primeiras injeções e incompleto nas últimas.

III. MATERIAL

III.1. Organismos

Staphylococcus aureus S-6

Staphylococcus aureus S-184

III.2. Meios de cultura

III.2.1. Meio seletivo : Meio Baird-Parker (Difco) adicionado de telurito de potássio e gema de ovo

III.2.2. Meio para produção de enterotoxinas estafilocócicas: Meio N-Z-Amine NAK (Digérido pancreático de caseína), Sheffield Chemical Co., suplementado com tiamina (0,00005%) e niacina (0,001%).

III.2.3. Meio de enriquecimento: Brain Heart Infusion (Difco)

III.3. Reagentes para testes bioquímicos característicos e diferenciais da espécie

III.3.1. Reativos para coloração de Gram.

III.3.2. Plasma liofilizado de coelho (Difco)

III.3.3. Meio específico para determinação das desoxirribonucleases termo-sensível e termo-resistente.

III.4. Reagentes para determinação de proteína

- III.4.1. Reagente para Fenol. Folin Ciocalteau (Qeel)
- III.4.2. Sulfato de cobre pentahidratado (Ecibra)
- III.4.3. Tartarato duplo de sódio e potássio (Qeel)
- III.4.4. Hidróxido de sódio (Merck)
- III.4.5. Carbonato de sódio (Sigma Chemical Company)
- III.4.6. Albumina de soro bovino (Sigma Chemical Company)

III.5. Material para determinação de enterotoxina estafilocócica Tipo B

- III.5.1. Enterotoxina estafilocócica tipo B, fornecido pelo Dr. Merlin S. Bergdoll do Food Research Institute.
- III.5.2. Soro anti-enterotoxina tipo B, fornecido pelo Dr. Merlin S. Bergdoll.
- III.5.3. Agar Noble (Difco)
- III.5.4. Molde para O.S.P. ("Optimal Sensitivity Plate"), modelo FRI, para análise em dupla difusão em gel.
- III.5.5. Placa de Petri de 50,0 mm de diâmetro.
- III.5.6. Tubos de ensaio de 4,0 x 100,0 mm simples difusão em gel, técnica de Dudin,
- III.5.7. Agulha de anestesia Raquidiana de 100,0x15,0 mm.
- III.5.8. Seringa de 1,0 mL.
- III.5.9. Filme de plástico Magipack.
- III.5.10. Tris (Hydroxymetil amino metano, nutricional Biochemicals Corporation).

III.6. Material para purificação de enterotoxina estafilocócica tipo B

- III.6.1. Coluna para cromatografia de 14,0 x 190,0 mm.
- III.6.2. Coluna para cromatografia de 22,0 x 410,0 mm.
- III.6.3. Resina Amberlite CG-50, 100-200 mesh (Mellinckrodt Chemical Works).
- III.6.4. Carboximetil celulose, tipo 20 (Schleicher e Schuell).
- III.6.5. Sacos de diálise (VWR Scientific Inc.).
- III.6.6. Polietileno glicol (Sigma Chemical Company).
- III.6.7. Tubos de centrifuga de 28.6 x 103.5 mm.
- III.6.8. Fosfato de sódio monobásico (Merck).
- III.6.9. Fosfato de sódio dibásico (Merck).
- III.6.10. Azida de sódio (Difco).

III.7. Material para imunização e sangria

- III.7.1. Enterotoxina estafilocócica tipo B, preparação bruta.
- III.7.2. Enterotoxina estafilocócica tipo B, purificada pelo FRI.
- III.7.3. Adjuvante de Freund (Difco).
- III.7.4. Seringa de 3.0 mL, com Louer-Lok.
- III.7.5. Seringa de 50.0 mL.
- III.7.6. Coelhos brancos de Nova Zelândia.
- III.7.7. Gaiolas de aço inox.

III.8. Equipamentos especiais

- III.8.1. Incubador "Shaker" circular com temperatura controlada, modelo G-25, New Brunswick Scientific Industries Co. Inc.
- III.8.2. Espectrofotômetro "Baush & Lomb" Spectronic 20.
- III.8.3. Espectrofotômetro Carl Zeiss, modelo M 4 Q III com Lâmpada de Deutério.
- III.8.4. Indicador Carl Zeiss P M Q II.
- III.8.5. Potenciômetro de pH, Corning digital 110, de escala expandida e resolução de 0.01 pH(0.01 pH expandido).
- III.8.6. Centrífuga refrigerada, modelo IEC B-20-A, International Equipment, USA.
- III.8.7. Banho termostaticado de temperatura "Fanen", modelo 169 de 220 V e 150W.
- III.8.8. Câmara incubadora para BOD, modelo 347 "Fanen" a 25°C.
- III.8.9. Câmara incubadora Fanen a 37°C.
- III.8.10. Balança semi analítica Mettler P 1200 N.
- III.8.11. Balança analítica Mettler H 35.
- III.8.12. Cyclo Mixer, Clay Adams, Division of Becton, Dickinson and Co.
- III.8.13. Paquímetro Mitutoyo.

IV. Métodos

IV.1. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em humanos

O isolamento de linhagens toxigênicas em portadores assintomáticos foi realizado em exudato nasal de 45 indivíduos jovens e saudáveis, utilizando-se zaragatoas umedecidas em salina 0,85% e posteriormente inoculadas em meio Baird-Parker. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. As colônias que apresentaram reação de lecitinase positiva, foram selecionadas para posterior análise de morfologia, através de esfregaços e coloração de Gram e para os ensaios de coagulase (4) e termonuclease (60). Para as colônias que apresentaram estes ensaios positivos, foi realizada a análise de enterotoxina, procedendo-se primeiramente à produção de enterotoxina através da técnica de celofane sobre agar (40,53). Para a identificação da enterotoxina B, foi utilizada a técnica de "Optimal Sensitivity Plate", O.S.P. (90).

IV.2. Teste de produção de coagulase (2)

Plasma liofilizado de coelho (Difco), foi reconstituído com 3,0 mL de água destilada, dividido em porções de 0,3 mL em tubos de 5,0 mm de diâmetro e inoculado com 0,1 mL de cultura de 18 horas em caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C e observados em intervalos de uma hora, durante quatro horas. O resultado foi interpretado segundo o código abaixo (4).

+4 Coágulo firme, não se move quando se inclina o tubo.

+3 Coágulo firme, se move quando se inclina o tubo.

+2 Coágulo não muito firme.

+1 Coágulo fraco.

IV.3. Teste de produção das desoxirribonucleases termo-sensível e termo-resistente (60)

O teste de produção das enzimas baseia-se na hidrólise do DNA contido no complexo agar-DNA-azul de toluidina. Após a reação, a coloração do indicador muda de azul para rosa.

A reação foi realizada em lâminas de vidro recobertas pela mistura Agar-DNA-Azul de toluidina, onde foram feitos orifícios de aproximadamente 4 mm de diâmetro, dispostos em fileira dupla e distanciados 20 mm entre si.

Culturas de 18 horas em caldo BHI foram divididas em duas partes, sendo uma aquecida em banho de água em ebulição, durante 20 minutos. Ambas foram inoculadas nas lâminas com auxílio de pipetas Pasteur utilizando-se os orifícios superiores para as culturas aquecidas e os inferiores para as que não sofreram tratamento térmico. A seguir, foram incubadas em câmara úmida a 37°C. A leitura foi realizada após quatro horas de incubação.

IV.4. Produção de enterotoxinas

IV.4.1. Produção de enterotoxina para análises

Os meios de cultura que propiciam a maior produção de enterotoxinas, possuem na sua composição, hidrolisados protéicos. A análise rotineira de enterotoxinas requer culturas concentradas, de maneira que o sobrenadante possa ser testado diretamente. Para este fim utilizam-se técnicas de produções com membrana de celofane que atuam como membrana de diálise, permitindo a passagem de moléculas pequenas, tais como os peptídeos, que compõe os meios de cultura e retendo a passagem de moléculas maiores, como as enterotoxinas.

Entre as técnicas que utilizam este princípio duas devem ser mencionadas: a) Culturas em placas sobre celofane ("Over Layer Agar") (39,52) e b) Culturas em sacos de celofane ("Sac Culture") (17,27).

Neste trabalho foi utilizado o método de culturas em placas sobre celofane. Foi utilizado um meio contendo 4% de triptona, 1% de extrato de levedura e 1.5% de agar, uma formulação sugerida por MELCONIAN et al. (65) com o intuito de substituir o meio N-Z-Amine NAK, o qual não é mais comercializado.

O meio de cultura previamente esterilizado foi vertido em placas de Petri, num volume de 20 mL por placa. Após a solidificação, o meio foi recoberto com a membrana de celofane estéril com o auxílio de uma pinça estéril.

A seguir 0,3 mL de cultura de 18 horas em BHI caldo foram inoculados sobre o celofane e espalhado com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

A cultura foi retirada da superfície do celofane com o auxílio da alça de Drigalski e 1,0 mL de tampão tris 0,05 M, pH 7,4, e transferida para tubos de centrífuga, repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, para retirar as células. O sobrenadante assim obtido foi analisado pelo método de OSP.

IV.4.2. Produção de enterotoxina para purificação

Em frascos erlenmeyer de 500 mL foram colocados 100 mL de meio de cultura N-Z-Amine NAK, suplementado com tiamina (0,00005%) e niacina (0,001%) e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Os frascos foram inoculados com 1% de cultura de *Staphylococcus aureus* S-6 de 18 horas, crescidos no mesmo meio. Os frascos foram incubados a 37°C durante 24 horas sob agitação de 350 rpm (26).

Para retirar as células, a cultura fermentada foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante de cultura foi diluído com 2 volumes de água destilada e ajustado a pH 6,4.

IV.5. Método de OSP ("Optimal Sensitivity Plate") (90)

modificação do método de Ouchterlony

O método de dupla difusão em gel, foi utilizado para a determinação qualitativa da enterotoxina. Este procedimento utiliza placas de Petri de 50 mm de diâmetro, recobertas com 4,0 mL de agar noble 1,2%, preparado com tampão tris 0,05 M, pH 7,4 e filtrado a quente através de papel Whattman nº 2, com auxílio de vácuo.

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

Ao orifício central foi adicionado anti-soro B na diluição 1:40; nos orifícios laterais menores, foi adicionado antígeno padrão, EEB, na concentração de 4.0 ug/mL e nos orifícios laterais maiores, foram adicionadas as soluções a serem testadas.

As placas assim preparadas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 24 horas. A câmara úmida foi obtida, recobrimdo-se uma placa de Petri de 250 x 25 mm, com algodão ou papel de filtro e adicionando-se água destilada até total umidificação.

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.

Para melhorar a visualização das linhas de precipitação, pode-se adicionar ácido fosfórico 0,1 M, ou ainda pode-se proceder à coloração das placas usando o corante Woolfast Pink.

IV.6. Método de Oudin (38,82,113)

Este método é baseado na técnica de simples difusão em gel, utilizando-se tubos de 4,0 mm de diâmetro, contendo uma mistura agar-anti-soro.

IV.6.1. Preparo do agar

Agar noble na concentração de 0,6% foi dissolvido e fundido em tampão tris 0,05 M, pH 7,4; a seguir filtrado a quente, através de papel Whatman nº 2, com auxílio de vácuo. O agar assim preparado foi estocado a 15°C, em volumes de 5,0 mL aproximadamente em tubos com rosca. Quando necessária a preparação de um novo conjunto de tubos, o agar foi fundido em banho de água em ebulição.

IV.6.2. Revestimento dos tubos

O agar preparado de acordo com o item acima, foi utilizado para o revestimento dos tubos. Isto se fez pelo enchimento e esvaziamento rápido dos mesmos com o agar, utilizando-se uma seringa de 1,0 mL com agulha de anestesia raquidiana de 100 x 15 mm, sendo os tubos imediatamente colocados em banho de gelo.

O conjunto de tubos assim preparado, foi colocado em dessecador durante pelo menos 24 horas.

IV.6.3. Preparo do agar-soro

O soro, diluído à metade da concentração final desejada, 1:20, com tampão tris, foi colocado em banho de água a 48°C. Igual volume de agar, fundido e resfriado a 48°C; foi adicionado à preparação anterior, obtendo-se a diluição de 1:40.

Os tubos revestidos foram preenchidos com aproximadamente 0,3 mL da solução de agar-soro, evitando-se escorrer a solução pelas paredes internas dos tubos, assim como a formação de bolhas de ar. Imediatamente os tubos foram levados a um banho de gelo.

IV.6.4. Preparo das soluções de antígeno

Utilizando-se tampão tris, a enterotoxina estafilocócica tipo B, foi diluída nas seguintes concentrações: 64, 32, 16, 8, 4 e 2 µg/mL. Um volume de aproximadamente 0,3 mL das soluções de antígeno foi adicionado a cada tubo contendo agar-soro. Os tubos foram selados com um filme de plástico e incubados a 25°C durante 7 dias.

IV.6.5. Leitura das bandas de precipitação e construção da curva padrão

Após o período de incubação o comprimento da banda de precipitação desenvolvida, foi medido com auxílio de um paquímetro; levou-se este valor a um gráfico contra o logaritmo das

respectivas concentrações de antígeno, o que permitiu obter a curva padrão, na qual, a cada valor de comprimento de banda correspondeu uma concentração de antígeno.

IV.7. Método de Lowry para determinação de proteína (61)

O método de Lowry para determinação de proteína, envolve numa primeira etapa a formação de um complexo cobre-proteína em solução alcalina. Este complexo reduz o reagente fosfomolibdico-fosfotungstato para dar uma cor azul intensa.

IV.7.1. Reagentes

- A: 2,0 g de Na_2CO_3 em 100 mL de NaOH 0.1 N
- B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1%
- C: Tartarato duplo de sódio e potássio 2%
- D: Misturar 100 mL de A + 1,0 mL de B + 1,0 mL de C
- E: 1 parte de reagente de Folin + 2 partes de H_2O

IV.7.2. Construção da curva padrão

A partir de uma solução de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albumina de soro bovino, foram cuidadosamente pipetados os seguintes volumes, em tubos de 16 x 150 mm : 0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; e 0,30 mL. Os tubos foram completados para o volume de 0,50 mL com água destilada.

A cada tubo foi adicionado 5,0 mL de reagente D, seguido

de agitação. Depois de 10 minutos, foi adicionado 0,50 mL de reagente E e agitado vigorosamente. Após 20 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro; utilizando o comprimento de onda de 600 nm, o que permitiu a construção da curva padrão, onde, para cada valor de absorbância correspondeu uma concentração de albumina.

IV.8. Purificação de enterotoxina B (95)

A purificação da enterotoxina B, consistiu basicamente de três cromatografias de troca iônica.

IV.8.1. Tratamento da resina para a primeira cromatografia (89)

A resina Amberlite CG-50 foi suspensa em água destilada (100 g/ 1,5 litros). Foram utilizados 6,0 gramas de resina para cada litro de cultura diluída. Ajustou-se a suspensão a pH 12 com NaOH 5,0 N, deixando-se em agitação durante 1 hora, com barra magnética. Em seguida, a resina foi lavada com água destilada, desprezando-se as partículas finas, até que o pH da água de lavagem atingisse o pH da água destilada. Posteriormente, ajustou-se a pH 2, com HCl 6,0 N. Após 1 hora de agitação, a resina foi lavada com água destilada até atingir o pH da mesma. A resina foi equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,4. Antes de usar a resina parcialmente neutralizada; foi lavada com água destilada para remover os sais do tampão.

IV.8.2. Primeira cromatografia

A enterotoxina foi removida da cultura diluída mediante adsorção na resina, por agitação com barra magnética, durante 60 minutos à temperatura ambiente.

A resina, contendo a enterotoxina e impurezas, foi transferida para uma coluna de cromatografia (22 x 410mm) e lavada com um volume de água destilada, correspondente ao volume da coluna.

A eluição foi realizada com tampão fosfato 0,5 M, pH 6,8 em NaCl 0,25 M, na velocidade de 2,5 mL/minuto.

As frações contendo 2,5 mL, que apresentaram absorvância maior que 2 a 277 nm, foram selecionadas para posterior análise de proteína e enterotoxina.

IV.8.3. Diálise

As frações que foram selecionadas para as etapas seguintes da purificação, foram dialisadas contra água destilada durante 24 horas, à temperatura ambiente com trocas a cada hora.

IV.8.4. Concentração

Após a diálise, as frações foram concentradas utilizando-se polietileno glicol diretamente sobre a membrana de diálise.

IV.8.5. Tratamento da resina para a segunda cromatografia (89)

A resina Amberlite CG-50 (20 gramas/grama de proteína) foi tratada segundo o item IV.8.1. A resina foi equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8 e lavada com água destilada, para remover os sais do tampão.

IV.8.6. Segunda cromatografia

A resina Amberlite CG-50 foi transferida para a coluna de cromatografia e o conjunto das frações da primeira cromatografia foi aplicado na parte superior da coluna.

Depois da adsorção da enterotoxina, a resina foi lavada com água destilada e eluída com fosfato dissódico 0,15 M.

As frações selecionadas segundo o critério utilizado para a primeira cromatografia, foram posteriormente dialisadas e concentradas de acordo com os itens IV.8.3 e IV.8.4

IV.8.7. Tratamento da resina para a terceira cromatografia (REISER, R. comun. pessoal)

A carboximetil celulose (20 g/g de proteína) foi tratada com NaOH 0,1 M durante 1 hora, com 3 a 4 agitações. A resina foi lavada com água destilada até que o pH da água de lavagem atingisse o pH da água destilada.

Ressuspendeu-se o CMC em HCl 0,1 M, durante 1 hora, com

3 a 4 agitações. Procedeu-se à lavagem como no passo anterior. Para o equilíbrio, a resina foi ressuspensa em tampão fosfato 0,01 M, pH 6,2.

IV.8.8. Terceira cromatografia

A resina foi empacotada na coluna de cromatografia e o conjunto de frações da etapa anterior foi aplicado na parte superior da mesma. Depois de adsorvida, a coluna foi lavada com um volume de tampão fosfato 0,01 M, pH 6,2.

A eluição foi realizada com gradiente linear de tampão fosfato de 0,02 M, pH 6,2 a 0,07 M, pH 6,8. As frações que apresentaram absorvância maior que 2 a 277 nm, foram selecionadas para análises posteriores. As frações que apresentaram uma alta relação enterotoxina/proteína foram selecionadas para análises quanto à pureza.

IV.8.9. Análise da pureza

Realizaram-se análises por imunodifusão em dupla dimensão, da enterotoxina purificada contra anti-soro polivalente, para verificação da presença de interferentes.

IV.9. Produção de anti-soro para enterotoxina estafilocócica tipo B (91)

Os métodos de identificação e quantificação das enterotoxinas estafilocócicas são baseados em reações sorológicas com

anticorpos específicos para cada enterotoxina. Uma vez que a enterotoxina estafilocócica é uma proteína de baixo peso molecular e baixa antigenicidade, a imunização foi realizada por injeção da enterotoxina com adjuvante de Freund.

IV.9.1. Imunização

Foram utilizados coelhos brancos de Nova Zelândia do sexo feminino com peso aproximado de 2,0 a 3,0 Kg, que representam animais adolescentes; capazes de dar boa resposta imunológica.

Foi utilizado um grupo de 5 animais, sendo que 4 receberam enterotoxina B purificada e 1 recebeu uma preparação bruta. Os animais foram imunizados segundo esquema proposto por ROBBINS (91)(Tabela 8).

A dose de enterotoxina foi dissolvida em 1,0 mL de solução estéril de tampão fosfato salino 0,05 M, pH 7,4 e emulsificada com 1,0 mL de adjuvante de Freund, através do bombeamento da mistura entre duas seringas acopladas por um adaptador.

A imunização foi realizada através de injeção subcutânea, sendo 1,0 mL da emulsão injetada em cada perna do animal. O animal foi pesado imediatamente antes, 24 e 48 horas após cada injeção, para monitorar a variação de peso; pois se houvesse uma perda maior que 200 gramas, o animal não deveria receber a próxima dose até que o peso fosse recuperado (Tabela 10).

Foi utilizado adjuvante de Freund completo nas primeiras injeções e o incompleto para as doses de reforço, isto é, as três últimas injeções.

IV.9.2. Análise do soro

A sangria foi realizada por punção intracardíaca. O sangue assim recolhido foi transferido para frascos previamente lavados com salina 0,85%. Após a coagulação, estes foram levados a um banho a 37°C durante 30 minutos, para acelerar a retração do coágulo. O soro assim obtido foi centrifugado a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

IV.9.2.1. Determinação do título do soro

O soro foi analisado segundo o método de WEISS e ROBBINS (114). O título é definido como o recíproco da diluição de soro que fornece uma banda de precipitação de 10,0 mm de comprimento quando ensaiado com enterotoxina B, na concentração de 10,0 µg/mL, pelo método de simples difusão em gel (Oudin) com incubação a 25°C por 7 dias.

IV.9.2.1.1. Preparo do agar e revestimento dos tubos

O preparo do agar e o revestimento dos tubos foram realizados de acordo com os itens IV.6.1 e IV.6.2.

IV.9.2.1.2. Preparo do agar-soro

Foram feitas diluições sucessivas do soro, em tampões tris, de modo a se obter 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; e 1:64, as

quais foram colocados em tubos em banho de água a 48°C. A cada tubo foi adicionado um volume equivalente ao volume do soro, de agar noble 0,6%, previamente fundido e resfriado a 48°C; de forma que, cada tubo teve uma diluição adicional de um fator de 2.

Aproximadamente 0,4 mL da mistura agar-soro foram transferidos para tubos de 4,0 mm de diâmetro.

IV.9.2.1.3 Preparo do antígeno

A enterotoxina B foi diluída em tampão tris, de modo a se obter uma concentração de 10,0 µg/mL.

Aproximadamente 0,4 mL de solução de antígeno, foram adicionados à cada tubo de reação. Os tubos foram selados com filme plástico e incubados a 25°C, durante 7 dias.

IV.9.2.1.4 Leituras das bandas de precipitação e construção das curvas

As bandas de precipitação foram lidas com auxílio de paquímetro e levou-se estes valores a um gráfico contra o logaritmo do recíproco das diluições. O título foi definido como o ponto em que a curva intercepta o comprimento de banda de 10,0 mm.

As curvas realizadas em diferentes dias para os soros dos 5 animais, estão mostradas nas figuras de 4 a 8.

IV.9.2.2. Análise da presença de anticorpos contra outras proteínas de Staphylococcus aureus

Realizaram-se análises por imunodifusão em dupla dimensão, dos soros obtidos contra o sobrenadante das linhagens de *S. aureus* S-6, que é uma linhagem altamente produtora de enterotoxina B, e *S. aureus* S-184, que é uma linhagem que produz diversas proteínas extracelulares em forma similar à *S. aureus* S-6 exceto a enterotoxina B.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Levantamento de *Staphylococcus aureus* em humanos

Encontrou-se que 24 pessoas, isto é, 53.3% da população em estudo era portadora de *Staphylococcus aureus*. Dentre os portadores, 17 pessoas (70,8%) apresentavam linhagens produtoras de enterotoxina B.

O número de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* citados na literatura é bastante variado, com valores compreendidos entre 18,2 (37) a 82% (87).

O valor encontrado para linhagens produtoras de enterotoxina B, 70,8%, é ligeiramente superior aos valores que aparecem na literatura americana, segundo estes autores, 68% são produtores de EEB (87).

V.2. Purificação de enterotoxina estafilocócica tipo B

O sobrenadante da cultura apresentou a concentração de 24,96 mg/mL de proteína e 0,33 mg/mL de enterotoxina B.

O volume de sobrenadante foi de 940 mL; portanto foram produzidos 310,20 mg de enterotoxina.

Após a adsorção da enterotoxina à resina, o sobrenadante apresentou 0,0062 mg/mL de enterotoxina, indicando que somente 292,72 mg da enterotoxina foi adsorvida à resina. Esta etapa teve portanto um rendimento de 94,4%.

Após a cromatografia, foi realizada a leitura da densidade ótica a 277 nm (Tabela 1), que forneceu os picos de proteína. Para as frações que corresponderam à enterotoxina B, foram feitas análises de proteína e de enterotoxina B, cujos valores são mostrados na Tabela 2 e Figura 1.

As frações 32 a 36 foram selecionadas para as etapas seguintes de purificação. Estas apresentaram um total de 234,00 mg de enterotoxina B. O rendimento desta etapa, isto é, considerando a enterotoxina eluída e a adsorvida; foi de 79,9%, e o rendimento total até esta etapa foi de 75,4%.

Realizada a segunda cromatografia, fez-se a leitura da densidade ótica a 277 nm (Tabela 3) e determinou-se a concentração de proteína e de enterotoxina B (Tabela 4 e Figura 2).

As frações 22 a 26 apresentaram um total de 171,40 mg de enterotoxina B, resultando num rendimento de 73,3%.

Na Tabela 5, está mostrada a leitura de densidade ótica das frações da terceira cromatografia e a Tabela 6 e Figura 3 apresentam as respectivas concentrações de proteína e enterotoxina B.

O resumo destes resultados é mostrado na Tabela 7. Os resultados obtidos foram condizentes com os valores obtidos por SCHANTZ *et al.* (95).

A enterotoxina purificada, quando ensaiada contra antissoro polivalente apresentou apenas uma linha de precipitação. O que demonstra um alto grau de pureza.

V.3. Produção de anti-soro para enterotoxina estafilocócica tipo B

De acordo com a literatura, a máxima produção de anticorpos ocorre na terceira semana após a última injeção. Neste experimento, os animais que apresentaram melhor resposta imunológica foram os identificados com os números 3 e 5. Com estes animais foram realizadas análises semanais. Para os animais de números 1, 2 e 4; foram realizadas análises somente a partir da terceira semana (Tabela 10).

Os títulos dos anti-soros obtidos foram condizentes com os valores apresentados pelo Food Research Institute (comunicação pessoal).

É aconselhável o uso de vários animais na obtenção de anti-soro, pois como foi verificado, somente dois animais apresentaram bom título, enquanto que os outros apresentaram respostas desfavoráveis. Além disso, existe o risco de perda de animais durante o experimento. Infelizmente neste experimento os animais que apresentaram as melhores respostas foram os que morreram, inclusive o animal número 5 adoeceu antes que seu título atingisse o pico, que deveria ocorrer na terceira semana, vindo a ter grande perda de peso e queda brusca do título.

Como foi mencionado anteriormente, apenas o animal número 5 recebeu uma preparação bruta de enterotoxina, os outros receberam enterotoxina purificada.

O soro do animal número 5, quando ensaiado com o sobrenadante de cultura de *Staphylococcus aureus* S-6, apresentou uma linha de precipitação forte que corresponde à enterotoxina B e várias outras linhas que se apresentam bastante tênues (Fig.10 e 11). Também aparecem linhas de precipitação quando este soro é ensaiado com sobrenadante de *Staphylococcus aureus* S-184 (linhagem não toxigênica) (Fig.13 e 14).

Os soros dos animais 1, 2, 3 e 4 apresentaram uma linha de precipitação muito nítida, e uma outra linha de precipitação bastante tênue, quando ensaiados com o sobrenadante de *Staphylococcus aureus* S-6 (Fig.9 e 11). Com estes soros não se observou linhas de precipitação quando se utilizou a linhagem *S. aureus* S-184 (Fig.12 e 14).

Verificou-se que mesmo os animais que receberam enterotoxina purificada, apresentaram anticorpos contra outras proteínas extracelulares de *Staphylococcus aureus* S-6, embora em menor número e intensidade que o animal que recebeu a preparação bruta.

VI. Conclusões

- 1- A partir do isolamento de **Staphylococcus aureus** em humanos, encontrou-se dados muito importantes. A porcentagem de pessoas portadoras deste microrganismo é bastante alta, 53,3%; o que confirmou a pesquisa realizada por REALI et al. (88) . Entretanto não se tem dados conclusivos a respeito da incidência deste microrganismo em humanos, pois a literatura citada apresenta grandes variações nas diferentes publicações assim como em relação ao tipo de enterotoxina produzida. Na presente pesquisa foram realizadas análises apenas para os produtores de enterotoxina B, e verificando-se uma porcentagem maior que as citados na literatura.
- 2- A presença de uma grande parcela da população portadora de **Staphylococcus aureus** enterotoxigênico, somada ao fato de que as enterotoxinas são proteínas que se caracterizam pela alta resistência ao calor, não sendo destruídas pelos tratamentos térmicos convencionais que ocorrem durante o processamento de alimentos, mostra claramente a razão pela qual as enterotoxinas estafilocócicas têm sido reconhecidas como uma das principais causas de envenenamento alimentar na maior parte dos países onde estes estudos têm sido realizados.

- 3- A formulação de meio contendo 4% de Triptona e 1% de Extrato de Levedura substitui perfeitamente o meio N-Z-Amine NAK, este último não é mais encontrado para comercialização.
- 4- Os resultados obtidos na purificação da enterotoxina B são condizentes com os valores apresentados na literatura.
- 5- Através das análises realizadas com a enterotoxina purificada, concluiu-se que a enterotoxina recuperada apresenta um alto grau de pureza, uma vez que houve formação de apenas uma linha de precipitação quando ensaiada contra antisoro polivalente, comportando-se de forma idêntica à enterotoxina padrão fornecida pelo Food Research Institute.
- 6- Através de análises realizadas com os soros obtidos, concluiu-se que o soro do animal imunizado com preparação bruta de enterotoxina apresentou maior variedade de anticorpos que os animais imunizados com enterotoxina purificada, isto foi intencional, pois era desejado um soro polivalente. Entretanto os soros dos animais que receberam enterotoxina purificada (FRI) apresentaram interferentes, ainda que em menor grau que o soro obtido com a preparação bruta; destes esperava-se obter um soro monovalente.

7- As análises do soro para a verificação do número de anticorpos precipitantes, precipitinas, contra antígenos do *Staphylococcus aureus* S-6, foram realizadas com o sobrenadante de cultura que apresentou 24,93 mg/mL de proteína total e 0,33 mg/mL de enterotoxina B, e o soro foi utilizado sem diluição. Entretanto para análises de cepas enterotoxigênicas ou para análises direta de enterotoxinas, o soro é utilizado em diluições altas, de modo que nestas diluições este se comporta como monovalente, portanto não há necessidade da purificação do soro por adsorção com a linhagem S-184 (BERGDOLL, M. S., comunicação pessoal).

8- Com os resultados obtidos do experimento com animais chegou-se à conclusão de que deve-se trabalhar com um número grande de animais, para que pelo menos um deles apresente boa resposta imunológica, além do que, a perda de um animal durante o experimento é imprevisível e irreparável.

BIBLIOGRAFIA

1. ADESIYUN, A.A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nigerian Ready-to-Eat Foods. *J. Food Protection* 47(6):438-440, 1984.
2. BAER, F.E.; GRAY, R.J.H. & ORTH, D.S. Methods for the Isolation and Enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. cap.31:374-386. ed. Marvin L. Speck.
3. BARBER, L.E. & DEIBEL, R.H. Effect of pH and Oxygen Tension on *Staphylococcal* Growth and Enterotoxin Formation in Fermented Sausage. *Appl. Microb.* 24(6):891-898, 1972.
4. BARRY, A.L.; LACHICA, R.V.F. & ATCHINSON, F.W. Identification of *Staphylococcus aureus* by Simultaneous Use of Tube Coagulase and Thermonuclease Testes. *Appl. Microbiol.* 25(3):496-497, 1973.
5. BERDAL, B.P.; OLSVIK, O. & OMLAND, T. A Sandwich ELISA Method for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 89B(6):411-415, 1981.
6. BERGDOLL, M.S.; SUGIYAMA, H. & DACK, G.M. *Staphylococcal* Enterotoxin. I. Purification. *Arch. Bioch. Bioph.* 85:62-69, 1959.

7. BERGDOLL, M.S.; SUGIYAMA, H. & DACK, G.M. The Recovery of Staphylococcal Enterotoxin from Bacterial Culture Supernatants by Ion Exchange. *J. Bioch. Microbiol. Technol. Engineer.* 3(1):41-50, 1961.
8. BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R. & AVENA, R.M. Identification of a New Enterotoxin as Enterotoxin C. *J. Bact.* 90:1481-1485, 1965
9. BERGDOLL, M.S. Immunization of Rhesus Monkey with Enterotoxoid B. *J. Infect. Diseases* 116:191-196, 1966.
10. BERGDOLL, M.S.; WEISS, K.F. & MUSTER, M.J. The Production of Staphylococcal Enterotoxin by Coagulase Negative Microorganisms. *Bact. Proc.* 12, 1967.
11. BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: *Microbial Toxins*. vol. III 265-327. ed. Thomas C. Montie, Solomon Kadis e Samuel A. Ajl, 1970.
12. BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N. & WEISS, K.F. Identification of Enterotoxin E. *Infect. Immunity* 4(5):593-595, 1971.
13. BERGDOLL, M.S. The Enterotoxins. In: *The Staphylococci*, cap. 12 301-331. ed. Jay D. Cohen. Wiley-Interscience-a Division of John & Sons, Inc. 1972.

14. BERGDOLL, M.S. & BENNETT, R.W. Staphylococcal Enterotoxins. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, cap 32:387-416. ed. Marvin L. Speck. 1976.
15. BERGDOLL, M.S. Staphylococcal Intoxications. In: Food Borne Infections and Intoxications, 2^e ed. Cap IX: 443-494. ed. Hans Riemann e Frank L. Bryan. 1979.
16. CASMAN, E.P. Further Serological Studies of Staphylococcal Enterotoxin. J. Bacteriol. 7:849-856, 1960
17. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Culture Medium for the Production of Staphylococcal Enterotoxin A. J. Bacteriol. 86:18-23; 1963.
18. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Food. Appl. Microbiol. 13(2):181-189, 1965.
19. CASMAN, E.P.; BENNETT, A.E. & ISSA, J.A. Identification of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. J. Bacteriol. 44(6):1875-1882, 1967.
20. CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E. & STONE, J.E. The Micro-Slide Gel Double Difusion Test for the Detection and Assay of Staphylococcal Enterotoxins. Health Lab. Science 6(4):185-198, 1969.

21. DAVIS, B.D.; DULBECO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.D. & MCCART, M. Staphylococci In: Microbiology 8th ed. New York, Hoeber Medical:727-740, 1970.
22. DAVISON, E. DACK, G.M. & CARY, W.E. Attempts to Assay the Enterotoxic Substance Produced by Staphylococci by Parenteral injection of Monkeys and Kittens. J. Infect. Disease, 62: 219-223, 1938.
23. DAVISON, E. & DACK, G.M. Staphylococcal Enterotoxin. J. Infect. Disease 64:302-306, 1939.
24. DELAZARI, I. & LEITAO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* Enteropatogênico em macarrão. Coletânea do Instituto de tecnologia de Alimentos, Campinas 7:485-497, 1976.
25. DEVRIESE, L.A. Identification of Pathogenic Staphylococci Isolated from Animals and Foods Derived from Animals. J. Appl. Bacteriol. 49(1):1-11, 1980.
26. DIETRICH, G.G.; WATSON, R.J. & SILVERMAN, G.J. Effect of Shaking on the Secretion of Enterotoxin B by *Staphylococcus aureus*. Appl. Microb. 24(4): 561-556, 1972.
27. DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A. & LEWIS, H. Serological Identification of Enterotoxigenic Staphylococci from Cheese. Appl. Microbiol. 15(6):1382-1387, 1967.

28. FORSGREN, A. Significance of Protein A Production by Staphylococci. *Infection and Immunity* 2(5):672-673, 1970.
29. FREA, J.I.; MCCOY, E. & STRONG, E.M. Purification of Type B Staphylococcal Enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 86(6): 1308-1313, 1963.
30. FREED, R.C.; EVERSON, M.L.; REISER, R.F. & BERGDOLL, M.S. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods. *Appl. and Environ. Microbiol.* 44(6):1349-1355, 1982.
31. FRIEDMAN, M.E. Inhibition of Staphylococcal Enterotoxin B Formation in Broth Cultures. *J. Bacteriol.* 92(1):277-278 1966.
32. FUNG, D.Y.C. & WAGNER, J. Capillary Tube Assay for Staphylococcal Enterotoxin A, B and C. *Appl. Microbiol.* 21(3):559-561 1971.
33. 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. Microb.* 26(6):938-942, 1973.
34. FUNG, D.Y.C.; REICHERT, C.A. & MEDWID, R.D. Use of the Microslide Technique to Measure Staphylococcal Enterotoxin B. *J. Milk Food Technol.* 39(7):486-489, 1976

35. GONDONI, S. & FINZI, G. Indagine Epidemiologica Sulla Diffusione di Portatori Sani di *Staphylococcus aureus* in Ambiente Ospedaliero. *Minerva Medica* 69:495-499, 1978.
36. GENIGEORGIS, C. & SADLER, W.W. Immunofluorescent Detection of Staphylococcal enterotoxin B. I. Detection in Culture Medium. *J. Food Sci.* 31:441-449, 1966
37. GENIGEORGIS, C.; REIMANN, H. & SADLER, W.W. Production of Enterotoxins in Cured Meats. *J. Food Sci.* 34(1):62-68, 1969.
38. HALL, H.E.; ANGELOTTI, R. & LEWIS, K.H.. Quantitative Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in Food Gel-Diffusion Methods. *Public Health Reports* 78(12):1089-1098, 1963.
39. HALLANDER, H.O. Production of Large Quantities of Enterotoxin B and other Staphylococcal Toxins on Solid Media. *Acta Pathol. Microb. Scand.* 63:299-305, 1965.
40. HALLANDER, H.O. Purification of Staphylococcal Enterotoxin B. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 67(1):117-132, 1966.
41. HARTWELL, S. MARRARO, R.V. & HARRIS, R.E. Incidence of *Staphylococcus aureus* for an Obstetric Population. *Obstetrics and Gynecology* 51(5):603-605, 1978.

42. HENNING, C.; HILLBORGH, U.; LINDVALL, K.; MARQVARDSEN, O.; SEL-
LERS, J. & WAHLIN, S. Comparison of *Staphylococcus aureus*
Carriage and Skin Infection Rates in Hospital and Office
Employees. *J. Hygiene* 83:437-444, 1979.
43. HIBNICK, H.E. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal Enterotoxin. II.
Chemistry. *Arch. Bioch. Bioph.* 85:70-73, 1959.
44. HIROOKA, E.Y. & MULLER, E.E. Isolamento, Caracterização e En-
tero patogenicidade de cepas de *Staphylococcus aureus* Iso-
lados de Produtos Cárneos Comercializados em Londrina, Pa-
raná. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2(2):123-133, 1982.
45. HUANG, I.Y. & BERGDOLL, M.S. The Primary Structure of Staphylo-
coccal Enterotoxin B. I. Isolation, Composition, and
Sequence of Tryptic Peptides from Oxidized Enterotoxin B.
The Journal of Biological Chemistry. 245(14):3493-3510,
1970.
46. HUANG, I.Y. & BERGDOLL, M.S. The Primary Structure of Staphylo-
coccal Enterotoxin B. II. Isolation, Composition, and
Sequence of Chymotryptic Peptides. *The Journal of Biologi-
cal Chemistry* 245(14):3511-3517, 1970.

47. 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 Biological Chemistry 245(14):3518-3525, 1970.
48. IANDOLO, J.J. & SHAFER, W.M. Regulation of Staphylococcal Enterotoxin B. Infection and Immunity 16(2):610-616, 1977.
49. IARIA, S.T.; FURNALETO, S.M.P. & CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* Enterotoxigênico nas Fossas Nais de Manipuladores de Alimentos em hospitais, São Paulo 1976. Revista de Saúde Pública 14:93-100, 1980.
50. INGRAN, M & KITCHELL, A.G. Salt as Preservative for Foods. J. Food Technol. 2:1-15, 1967.
51. JAMLANG, E.M.; BARTLETT, M.L. & SNYDER, H.E. Effect of pH, Protein Concentration and Ionic Strength on the Heat Inactivation of Staphylococcal Enterotoxin B. Appl. Microb. 22(6):1034-1040, 1971.
52. JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of High Titers of Enterotoxins for the Routine Testing of Staphylococci. Appl. Microbiol 19(4):689-699, 1970.

53. JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of Extracellular Enzymes and Enterotoxins A, B, and C by *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 4(2):110-115, 1971.
54. JARVIS, A.W.; LAWRENCE, R.C. & PRITCHARD, G.G. Production of Staphylococcal Enterotoxins A, B, and C under Conditions of Controlled pH and Aeration. *Infect. Immunity* 7(6):847-853, 1973.
55. JOHNSON, H.M.; HALL, H.E. & SIMON, M. Enterotoxin B: Serological Assay in Cultures by Passive Hemagglutination. *Appl. Microbiol.* 15(4):815-818, 1967.
56. JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMAN, P.E. & PEELER, J.T. Staphylococcal Enterotoxin B: Solid Phase Radioimmunoassay. *Appl. Microb.* 22(5):837-841, 1971.
57. JOZEFczyk, Z.; ROBBINS, R.N.; SPITZ, J.M. & BERGDOLL, M.S. Antibodies to Staphylococcal Enterotoxin in Laboratory Personnel. *J. Clin. Microbiol.* 11(4):438-439, 1980
58. KELLER, G.M.; HANSON, R.S. & BERGDOLL, M.S. Effect of Mineral on Staphylococcal Enterotoxin B Production. *Infect. Immun.* 20(1):158-160, 1978.

59. LACHICA, R.V.F.; WEISS, K.F. & DEIBEL, R.H. Relationships Among Coagulase, Enterotoxin and Heat-stable Deoxyribonuclease Production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microb.* 18(1): 126-127, 1969.
60. LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C. & HOEPRICH, P.D. Metachromatic Agar Diffusion Methods for Detecting Staphylococcal Nuclease Activity. *Appl. Microbiol.* 21(4):585-587, 1971.
61. LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
62. LYNCK, M.B.; PRADO, V. & GONZALEZ, A. Manipuladores de Alimentos como Fuente Potencial de Infeccion Intrahospitalaria. *Rev. Med. Chile* 103:389-390, 1963.
63. MAH, R.A.; FUNG, D.Y.C. & MORSE, S.A. Nutritional Requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. *Appl. Microbiol.* 15(4):866-870, 1967.
64. MCLEAN, R.A.; LILLY, H.D. & ALFORD, J.A. Effects of Meat-Curins Salts and Temperature on Production of Staphylococcal Enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 95(4):1207-1211, 1968.

65. MELCONIAN, A.K.; FLANDROIS, F.P. & FLEURETTE, J. Modified Method for Production and Purification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. *Appl. and Environ. Microbiol.* 45(3):1140-1143, 1983.
66. METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D.; COLLINS II, W.S. & MCGANN, V. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B Release (Excretion) Under Controlled Conditions of Fermentation. *Appl. Microb* 25(5):70-773, 1973.
67. MEYER, R. & PALMIERI, M.J. Single Radial Immunodiffusion Method for Screening Staphylococcal Isolates for Enterotoxin. *Appl. and Environ. Microbiol.* 40(6):1080-1085, 1980.
68. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food Intoxication. A Review. I. The Staphylococci: Characteristics, Isolation, and Behavior in Artificial Media. *J. Milk Food Technol.* 34(11):557-564, 1971.
69. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food Intoxications. A Review. II. Enterotoxins and Epidemiology. *J. Milk Food Technol.* 35(1):21-29, 1972.
70. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food Intoxication. A Review. III. Staphylococci in Dairy Foods. *J. Milk Food Technol.* 35(2):77-82, 1972.

71. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food Intoxications. A Review. IV. Staphylococci in Meat, Bakery Products, and Other Foods. J. Milk Food Technol. 35(4):228-241, 1972.
72. MINOR, T.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.
73. MORSE, S.A. & MAH, R.A. Microtiter Hemmagglutination-Inhibition Assay for Staphylococcal Enterotoxin B. Appl. Microbiol. 15(1):58-61, 1967.
74. MORSE, S.A.; MAH, R.A. & DOBROGOSZ, W.J. Regulation of Staphylococcal Enterotoxin B. J. Bacteriol. 98(1):4-9, 1969.
75. MORSE, S.A. & BALDWIN, J.N. Regulation of Staphylococcal Enterotoxin B: Effect of Thiamine Starvation. Appl. Microb. 22(2):242-249, 1971.
76. MORSE, S. & BALDWIN, J.N. Factors Affecting the Regulation of Staphylococcal Enterotoxin B. Infect. and Immunity 7(6):839-846, 1973.

77. MORSE, S.A. & MAH, R.A. Regulation of Staphylococcal Enterotoxin B: Effect of Anaerobic Shock. *Appl. Microb.* 25(4): 553-557, 1973.
78. NIYOMVIT, N.; STEVENSON, K.E. & Mc FELTS, R.F. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B by Affinity Radioimmunoassay. *J. Food Sci.* 43(3):735-739, 1978.
79. OLSVIK, O.; BERDAL, B.P.; FOSSUM, K. & OMLAND, T. Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus* Related to the Origin of the Strains. *Acta Path. Microb. Scand.* 89B(6):423-426, 1981.
80. OLSVIK, O.; FOSSUM, K. & BERDAL, B.P. Staphylococcal Enterotoxin A, B, and C Produced by Coagulase-Negative Strains Within the Family *Micrococcaceae*. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 90B(6):441-444, 1982.
81. OUCHTERLONY, O. Antigen Antibody reactions in Gels. *Acta Path. Microb. Scand.* 25:507-515, 1949.
82. OUDIN, J. III Technique and Analyses of the Quantitative Precipitation Reaction. B. Specific Precipitation in Gels and its Application to Immuno chemical Analyses. *Methods in Medical Research* 5:535-5578, Chicago 1952.

83. 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.
84. RAJ, H.D. & BERGDOLL, M.S. Effect of Enterotoxin B on Human Volunteers. *J. Bacteriol.* 98(2):833-834, 1969.
85. READ, R.B. & BRADSHAW, J.G. Thermal Inactivation of Staphylococcal Enterotoxin B in Veronal Buffer. *Appl. Microbiol.* 14:130-134, 1966.
86. READ, R.B. & BRADSHAW, J.G. γ Irradiation of Staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Microbiol.* 15(3):603-605, 1967.
87. REALI, D. Enterotoxin A and B Production in Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Human Beings and Foods. *J. Hygiene*, 88:103-106, 1982.
88. REISER, R.F. & WEISS, K.F. Production of Staphylococcal Enterotoxins A, B and C in Various Media. *Appl. Microbiol.* 18(6):1041-1043, 1969.
89. REISER, R.; CONAWAY, D. & BERGDOLL, M.S. Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods. *Appl. Microbiol.* 27(1):83-85, 1974.

90. ROBBINS, R.N.; GOULD, S. & BERGDOLL, M.S. Detecting the Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* Strains. *Appl. Microbiol.* 28(6):946-950, 1974.
91. ROBBINS, R.N. & BERGDOLL, M.S. Production of Rabbit Antisera to the Staphylococcal Enterotoxins. *J. Food Prot.* 47(3):172-176, 1984.
92. SATTERLEE, L.D. & KRAFT, A.A. Effect of Meat and Isolated Meat Proteins on the Thermal Inactivation of Staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Microb.* 17(6):906-909, 1969.
93. SAUVAGE, J.P. *Le Monde Bactérien O.R.L. En: L'Antibiothérapie en ORL. Guide des lésions bactériennes rencontrées en Pathologie Cervico-Faciale.* Beecham-Sevigne, 1979.
94. SAUNDER, G.C. & BARTLET, M.L. Double Antibody Solid-Phase immunoassay for the Detection of Staphylococcal Enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:518-522, 1977.
95. SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.G.; WAGMAN, J.; SPERO, L.; DUNNERY, D.A. & BERGDOLL, M.S. Purification of Staphylococcal Enterotoxin B. *Biochemistry* 4(6):1011-1016, 1965.

96. SCHEUSNER, D.L.; HOOD, L.L. & HARMON, L.G. Effect of Temperature and pH on Growth and Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus*. J. Milk Food Technol. 36(5): 249-252, 1973.
97. SCHLEIFER, K.H. Gram-Positive Cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2, Section 12:999-1035. ed. SNEATH, H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. Williams & Wilkins-Baltimore-USA, 1986
98. SHIBATA, Y.; MORITA, M.; AMANO, Y & ISHIDA, N. The Passive Hemagglutination Inhibition Tests for Detection of Staphylococcal Enterotoxin B with Sensitized and Lyophilized Red Blood Cells. Microbiol. Immunol. 21(1):45-48, 1977.
99. SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R. & HOWARD, M. Rapid, Sensitive Assay for Staphylococcal Enterotoxin and a Comparison of Serological Methods. Appl. Microbiol. 16(7): 1019-1023, 1968.
100. SIMKOVICOVA, M. & GILBERT, R.J. Serological Detection of Enterotoxin from Food-Poisoning Strains of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 4:19-30, 1971.
101. SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L. & PALUMBO, S.A. Effect of Food Environment on Staphylococcal Enterotoxin Synthesis: A Review. J. Food Protection 46(6):545-555, 1983.

102. STIFFLER-ROSEMBERG, G. & FEY, H. Simple Assay for Staphylococcal Enterotoxins A, B, e C: Modification of Enzyme Linked Immunosorbent Assay.. Journal Clinical Microbiol. 8 (5):473-479, 1978.
103. STONE, R.V. Staphylococccic Food-Poisoning and Dairy Products J. Milk Techonol. 6:7-16, 1943.
104. SURGALLA, M.J. A Study of the Production of Staphylococcal Enterotoxin in Chemically Defined Mediums. J. Infec. Dis. 81(2):97-111, 1947.
105. SURGALLA, M.J.; KADAVY, J.D.; BERGDOLL, M.S. & DACK, G.M. Staphylococcal Enterotoxin : Production Methods. J. Infect. Diseases 89:180-184, 1951.
106. SURGALLA, M.J.; BERGDOLL, M.S. & DACK, G.M. Staphylococcal Enterotoxin Neutralization by Rabbit Antiserum. J. Immunol. 72:398-303, 1954.
107. TATINI, S.R. Thermal Stability of Enterotoxins in Foods. J. Milk Food Technol. 39(6):432-438, 1976.
108. THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Recommended Methods for Microbiological Examination. In: Microorganisms in Foods, 114-123 University of Toronto Press, 1968.

109. TOSHACH, S. & THORSTEINSON, S. Detection of Staphylococcal Enterotoxin by Gel Diffusion Test. Canadian J. Public Health 63:58-66, 1972
110. TROLLER, J.A. & STINSON, J. Influence of Water Activity on Growth and Enterotoxin Formation by *Staphylococcus aureus* in Foods. J. Food Sci. 40(4):802-804, 1975.
111. VANDENBOSCH, L.L.; FUNG, D.Y. & WIDOMSKI, M. Optimum Temperature for Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus* S-6 and 137 in Liquid Medium. Appl. Microb. 25(3):498-500 1973.
112. WADSWORTH, C. A Slide Microtechnique for the Analysis of Immune Precipitates in Gel. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 10:355-360, 1957
113. WEIRETHER, F.J.; LEWIS, E.E.; ROSENWALD, A.J. & LINCOLN, R.E. Rapid Quantitative Serological Assay of Staphylococcal Enterotoxin B. Appl. Microb. 14(2):284-291, 1966.
114. WEISS, K.F. & ROBBINS, R.N. Relationship Between Staphylococcal Antiserum Titer and Zone Development on Immune Serum Plates. Appl. Microbiol. 19(6):911-914, 1970.

115. WIENEKE, A.A. Enterotoxin Production by Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Foods and Humans Beings. *J. Hyg.* 73:255-262, 1974.

116. WU, C.H. & BERGDOLL, M.S. Stimulation of Enterotoxin B Production. II. Synthetic Medium for Staphylococcal Growth and Enterotoxin B Production. *Infection and Immunity* 3(6):784-792, 1971.

TABELA 1. Leitura da densidade ótica das frações da primeira cromatografia*, a 277 nm

Frações	D.O.	Frações	D.O.	Frações	D.O.
1	>2	20	>2	39	>2
2	>2	21	>2	40	>2
3	>2	22	>2	41	>2
4	>2	23	>2	42	>2
5	>2	24	>2	43	>2
6	>2	25	>2	44	>2
7	>2	26	2	45	>2
8	>2	27	1,9	46	>2
9	>2	28	>2	47	>2
10	>2	29	>2	48	>2
11	>2	30	>2	49	>2
12	>2	31	>2	50	>2
13	>2	32	>2	51	>2
14	>2	33	>2	52	>2
15	>2	34	>2	53	>2
16	>2	35	>2	54	2
17	>2	36	>2	55	1,9
18	>2	37	>2	56	1,8
19	>2	38	>2	57	1,7

A cromatografia foi realizada em Amberlite CG-50 e eluída com tampão fosfato 0,5 M pH 6,8 em NaCl 0,25 M.

TABELA 2. Concentração de proteína e enterotoxina B nas frações da primeira cromatografia*

Frações	Proteína# (mg/mL)	Enterotoxina B## (mg/mL)
30	9,45	3,50
31	19,20	8,10
32	26,52	15,20
33	36,72	20,00
34	42,40	23,00
35	36,60	19,00
36	33,48	16,40
37	31,62	12,60
38	28,80	11,50
39	26,52	6,45
40	18,30	5,20

* Resina-Amberlite CG-50

Método de Lowry

Método de Oudin

TABELA 3. Leitura da densidade ótica das frações da segunda cromatografia*, a 277 nm

Frações	D.O.	Frações	D.O.	Frações	D.O.
1	0,008	16	0,05	31	1,70
2	0,009	17	0,07	32	1,35
3	0,012	18	0,08	33	1,05
4	0,018	19	0,10	34	0,09
5	0,210	20	0,18	35	0,07
6	0,250	21	>2	36	0,10
7	0,300	22	>2	37	0,42
8	0,090	23	>2	38	0,38
9	0,086	24	>2	39	0,33
10	0,070	25	>2	40	0,28
11	0,062	26	>2	41	0,25
12	0,056	27	>2	42	0,20
13	0,052	28	>2	43	0,19
14	0,040	29	>2	44	0,16
15	0,034	30	>2	45	0,14

A comatografia foi realizada em Amberlite CG-50 e eluída com fosfato dissódico 0,15 M.

TABELA 4. Concentração de proteína e enterotoxina B nas frações da segunda cromatografia*

Frações	Proteína# (mg/mL)	Enterotoxina B## (mg/mL)
21	5,88	4,05
22	22,44	15,20
23	24,57	18,50
24	22,11	16,50
25	16,74	10,56
26	13,72	7,80
27	10,62	6,00
28	9,30	4,05

* Resina-Amberlite CG-50

Método de Lowry

Método de Oudin

Tabela 5. Leitura da densidade ótica das frações da terceira cromatografia*, a 277 nm

Frações	D.O.	Frações	D.O.	Frações	D.O.
1	-	14	0,010	27	>2
2	-	15	0,014	28	>2
3	-	16	0,016	29	>2
4	-	17	0,050	30	>2
5	-	18	0,145	31	1,80
6	-	19	0,260	32	1,20
7	-	20	0,350	33	0,80
8	-	21	0,60	34	0,54
9	-	22	1,50	35	0,34
10	0,225	23	>2	36	0,17
11	0,020	24	>2	37	0,14
12	0,018	25	>2	38	0,12
13	0,016	26	>2	39	0,09

A comartografia foi realizada em carboxi metil celulose e eluída com gradiente linear de tampão fosfato de 0,02 M pH 6,2 a 0,07 M pH 6,8.

TABELA 6. Concentração de proteína e enterotoxina B nas frações da terceira cromatografia*

Frações	Proteína# (mg/mL)	Enterotoxina B## (mg/mL)
23	6,88	3,68
24	10,70	7,50
25	14,07	12,00
26	16,74	15,20
27	14,08	12,50
28	11,40	7,68
29	7,44	4,25
30	5,28	2,72

* Resina Carboximetil Celulose

Método de Lowry

Método de Oudin

Tabela 7. Quadro geral das etapas de purificação

	Volume mL	Proteína (mg)	Enterot.B (mg)	Rend. %	Enterot.. <u>Proteína</u>
A	940	23.462,40	310,20		0,013
B#	-	789,60	292,71	94,4	0,37
C	10	439,30	234,00	79,9	0,53
D	10	249,00	171,40	73,3	0,69
E	10	167,50	137,20	80,0	0,82
F	2820 *	22.672,80	17,49	-	0,00077

A= Sobrenadante de cultura fermentada

B= Valores para o material adsorvido à resina

C= Valores para as frações combinadas da primeira cromatografia

D= Valores para as frações combinadas da segunda cromatografia

E= Valores para as frações combinadas da terceira cromatografia

F= Sobrenadante de cultura após adsorção com a primeira resina

Foi calculado: $B = A - F$

* O sobrenadante foi diluído com dois volumes de água antes da adsorção

TABELA 8. Esquema de imunização

=====								
Dia	0	3	8	24	28	63	66	70
.....								
Dose de toxina (µg)	1	3	10	20	30	50	100	300
=====								

TABELA 9. Peso dos animais (Kg) durante a imunização

Dia	Animal				
	1	2	3	4	5
0#	3,155	3,155	3,315	2,915	3,565
1	3,150	3,065	3,315	2,915	3,575
2	3,065	3,055	3,280	2,905	3,555
3#	3,065	3,050	3,280	2,825	3,545
4	3,025	2,975	3,255	2,875	3,455
7	2,995	2,985	3,270	2,900	3,405
8#	3,005	3,000	3,275	2,895	3,420
9	2,965	2,935	3,245	2,845	3,365
23	3,000	2,980	3,350	2,940	3,420
24#	3,030	3,030	3,410	2,910	3,410
25	3,000	3,040	3,240	2,790	3,400
28#	2,870	3,080	3,210	2,760	3,360
29	3,030	3,090	3,430	2,930	3,540
30	3,020	3,130	3,480	3,010	3,600
63#	2,970	3,280	3,680	3,010	3,630
64	2,850	3,260	3,530	3,050	3,480
66#	2,980	3,320	3,650	2,980	3,550
67	2,980	3,230	3,600	3,080	3,380
70#	3,120	3,330	3,610	3,150	3,350

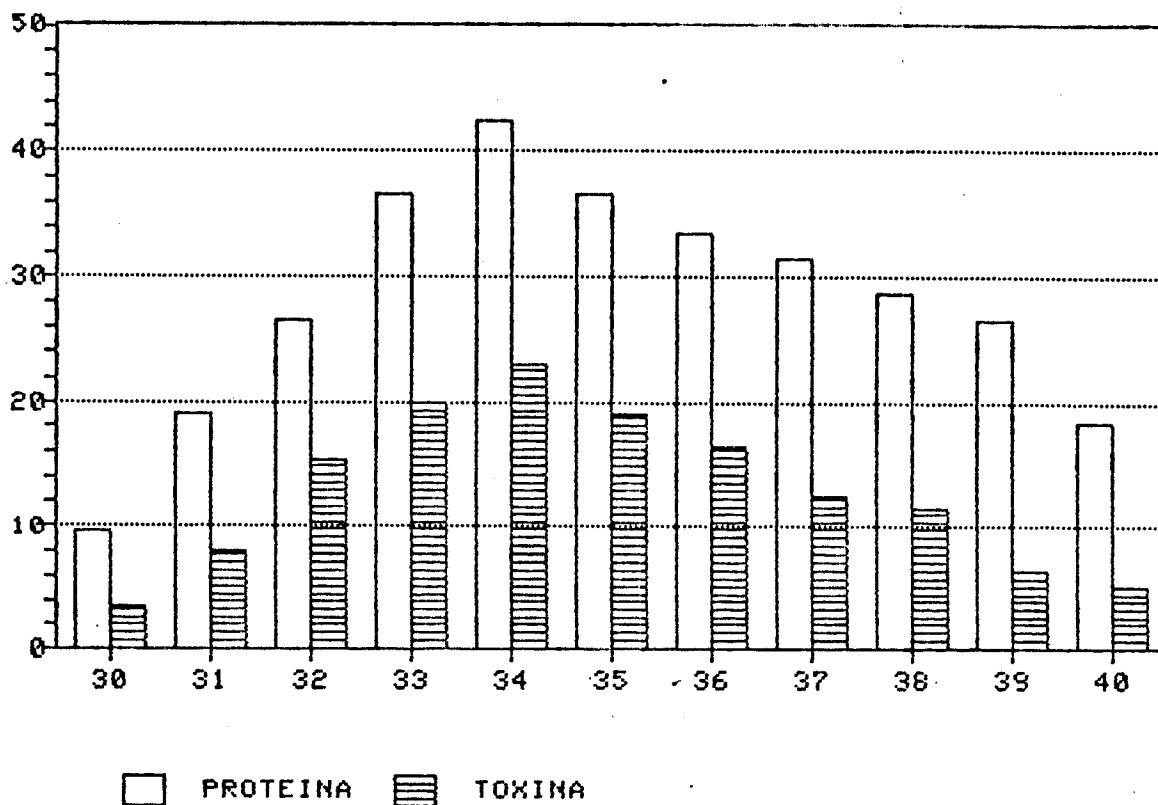
Data de injeção

Tabela 10. Títulos dos soros em diferentes dias após a
última injeção

Dias Após a última Injeção							
Animal	7	16	23	30	36	49	56
1	NR	NR	49,0	37,0	32,0	29,5	27,5
2	NR	NR	47,5	34,0	24,5	19,5	15,5
3	37,0	62,0	74,0	70,0	50,0	36,0	--
4	NR	NR	34,0	28,0	23,0	19,0	17,5
5	60,0	86,0	26,0	14,5	--	--	--

NR: Não Realizada

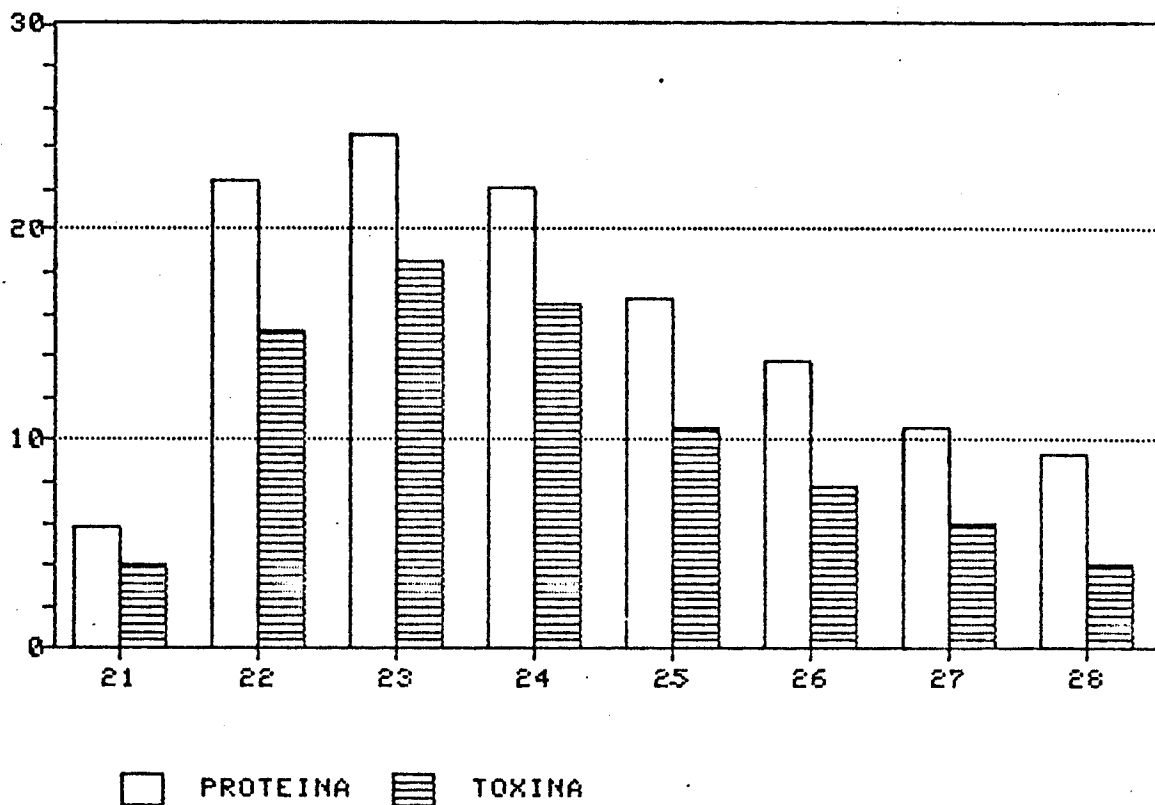
--: Morte do Animal



Abcissa: Frações

Ordenada: Concentração (mg/mL)

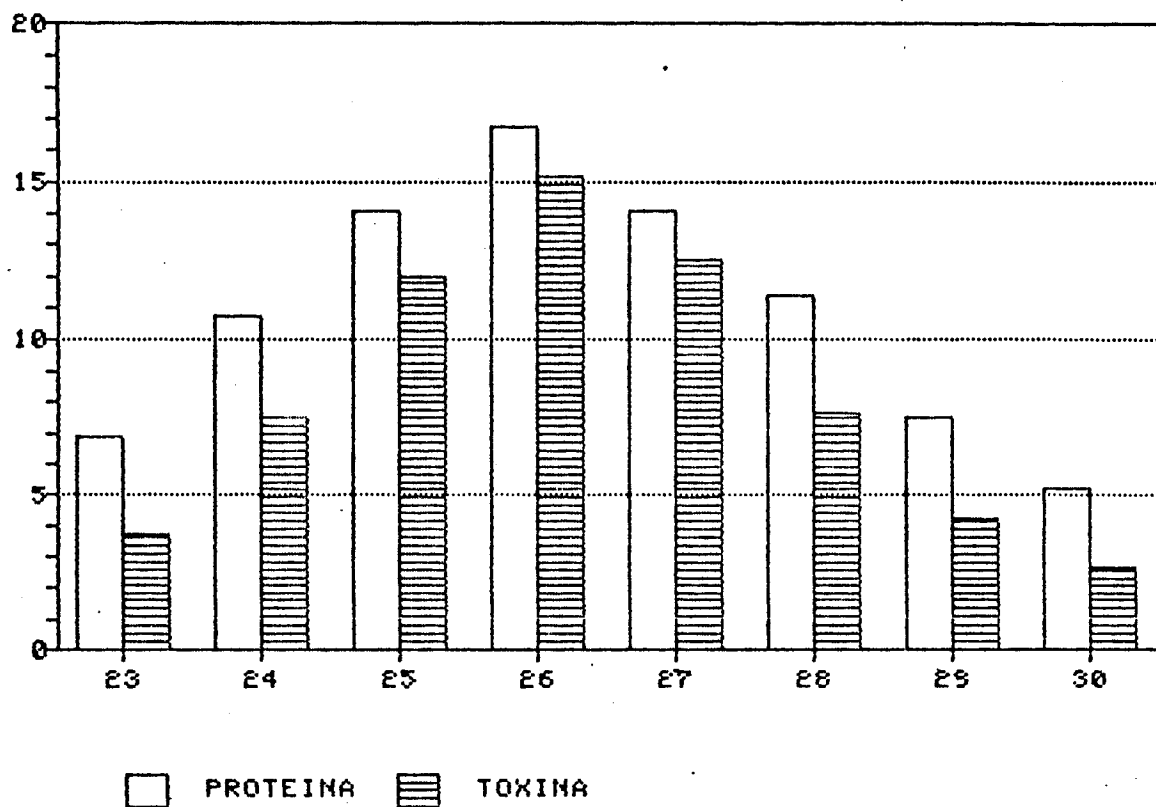
FIGURA 1. Concentração de proteína total (barras claras) e enterotoxina B (barras listradas), para as frações da primeira cromatografia em Amberlite CG-50.



Abcissa: Frações

Ordenada: Concentração (mg/mL)

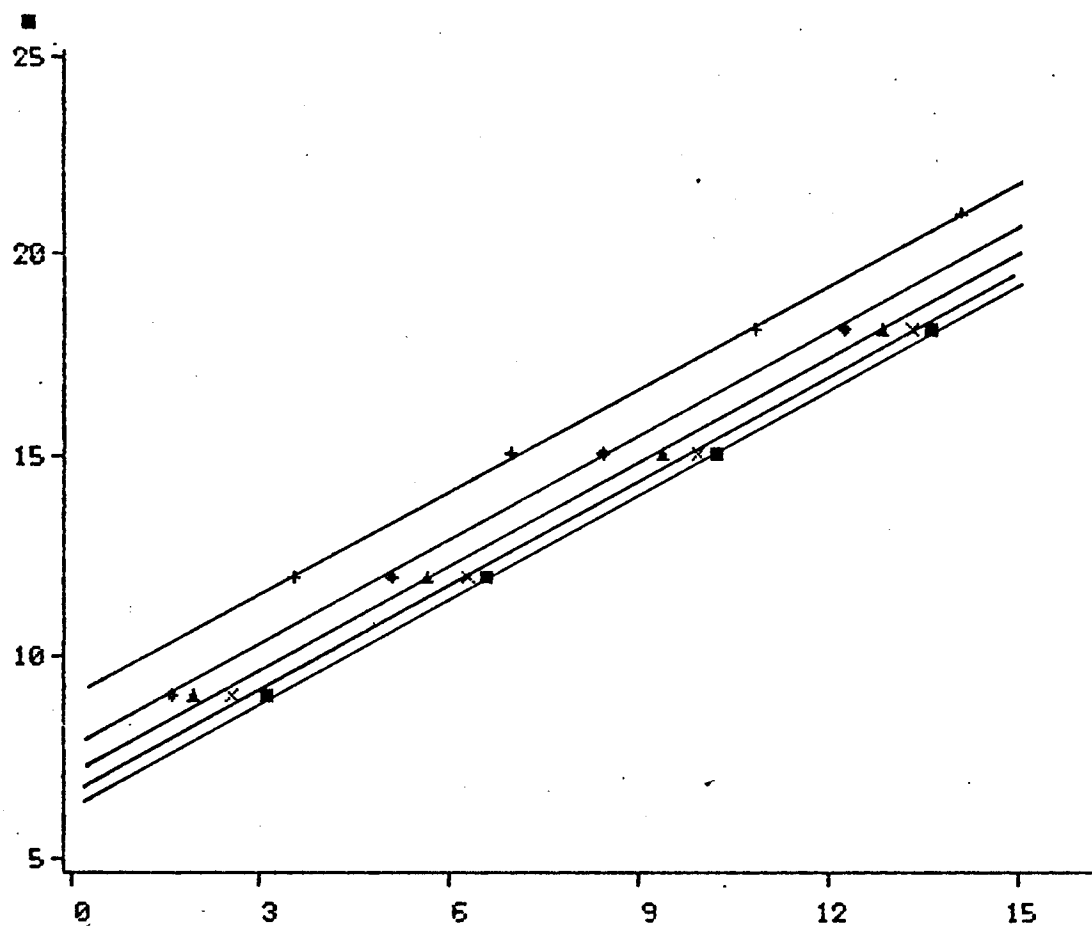
FIGURA 2. Concentração de proteína total (barras claras) e enterotoxina B (barras listradas), para as frações da segunda cromatografia em Amberlite CG-50.



Abcissa: Frações

Ordenada: Concentração (mg/mL)

FIGURA 3. Concentração de proteína total (barras claras) e enterotoxina B (barras listradas), para as frações da terceira cromatografia em Carboximetil Celulose.

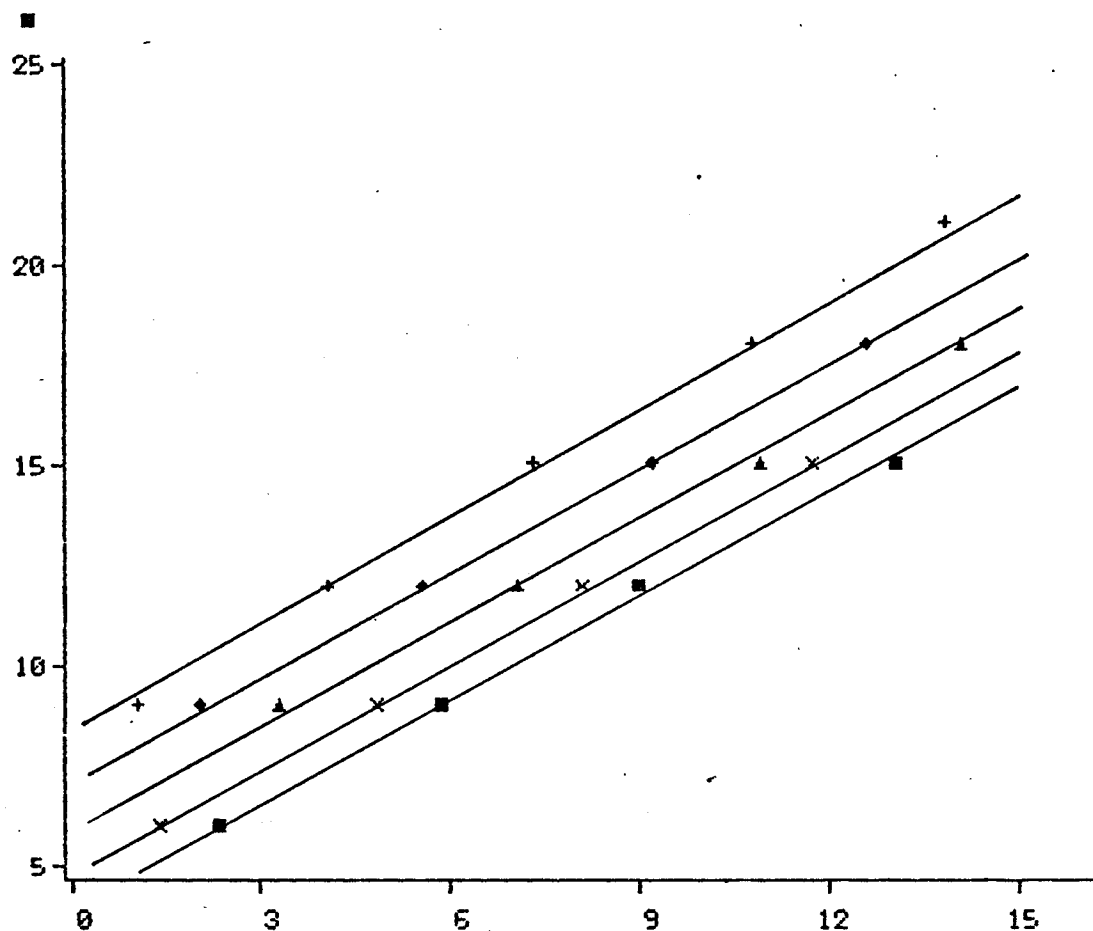


Abcissa: Comprimento (mm)

Ordenada: Logarítmo do recíproco da diluição (x 10)

FIGURA 4. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal N^o1 em diferentes dias após a última injeção.

+ = 23; ◆ = 30; ▲ = 36; x = 49 e ■ = 56 dias.

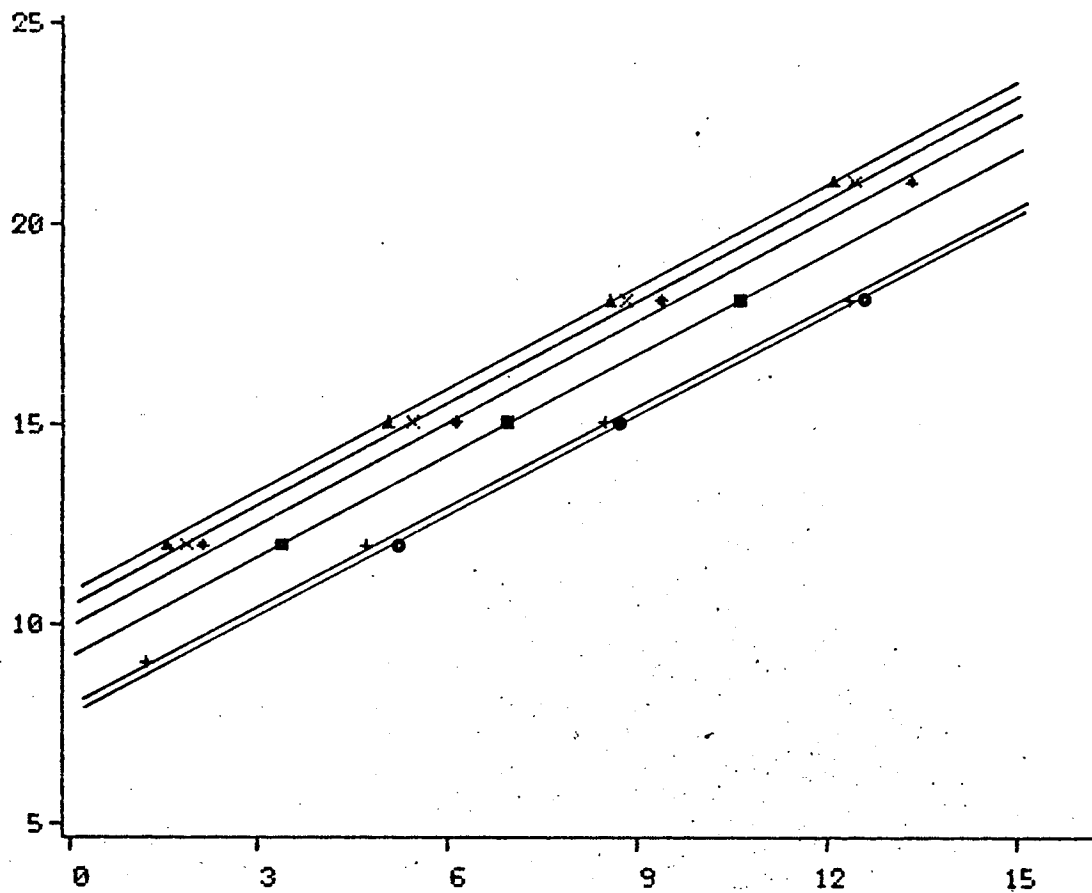


Abcissa: Comprimento (mm)

Ordenada: Logaritmo do recíproco da diluição (x 10)

FIGURA 5. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal Nº 2 em diferentes dias após a última injeção.

+ = 23; ◆ = 30; ▲ = 36; x = 49 e ■ = 56 dias.

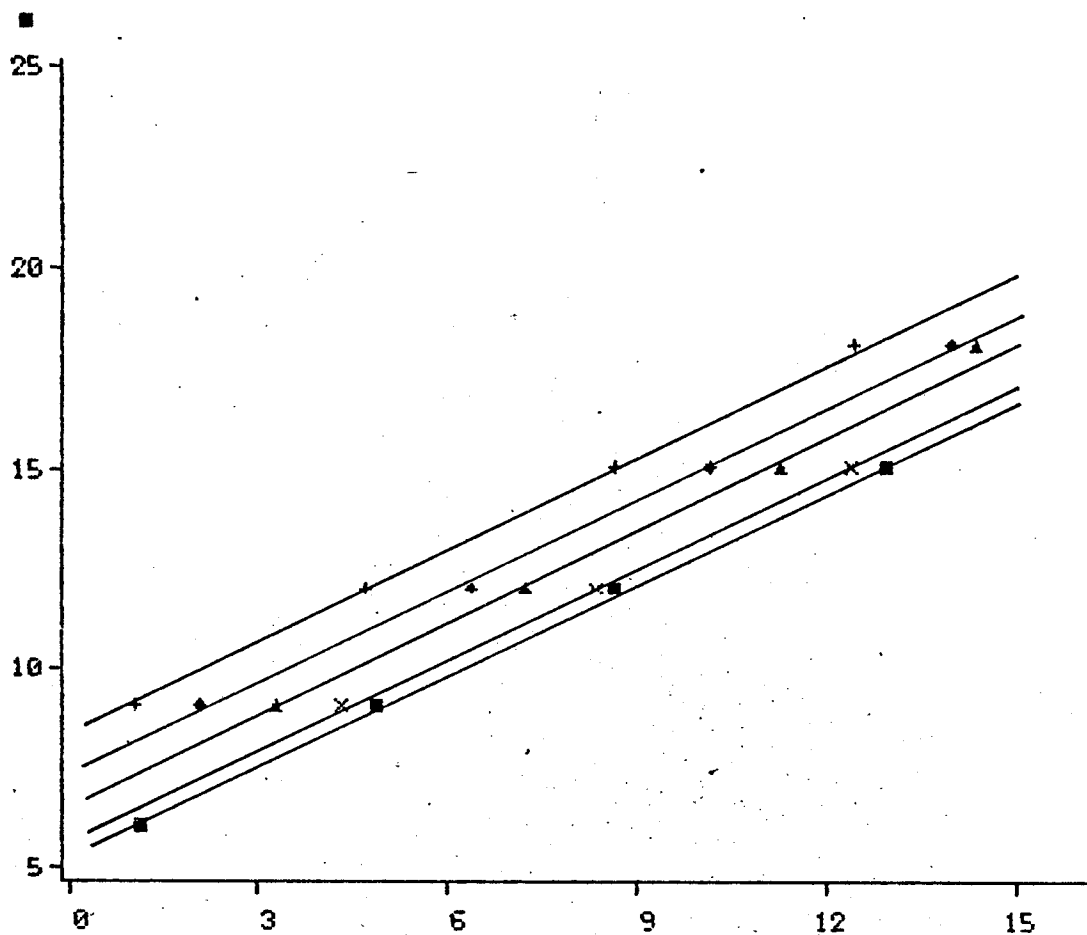


Abcissa: Comprimento (mm)

Ordenada: Logarítmo do Recíproco da Diluição ($\times 10$)

FIGURA 6. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal N^o 3 em diferentes dias após a última injeção.

+ = 7; ◆ = 16; ▲ = 23; x = 30; ■ = 36 e ● = 49 dias.

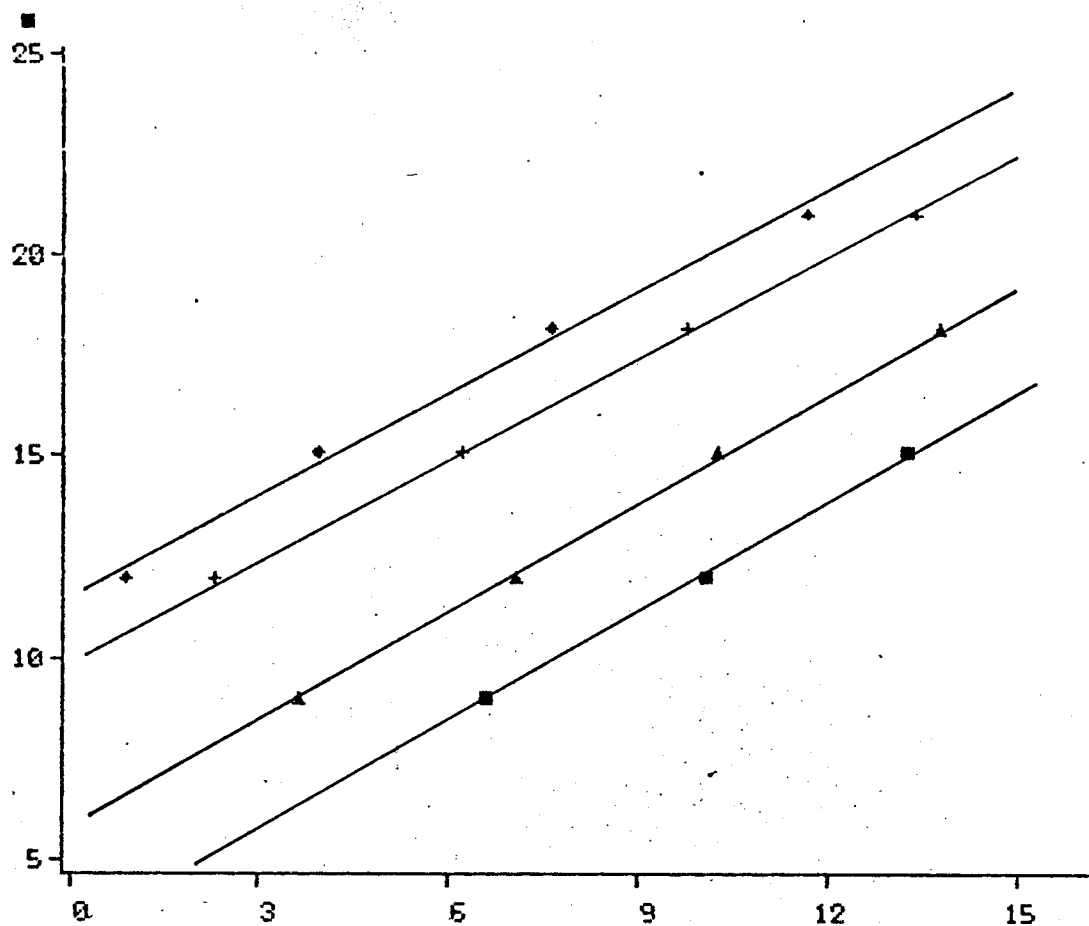


Abcissa: Comprimento (mm)

Ordenada: Logaritmo do recíproco da diluição (x 10)

FIGURA 7. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal Nº 4 em diferentes dias após a última injeção.

+ = 23; ◆ = 30; ▲ = 36; x = 49 e ■ = 56 dias.

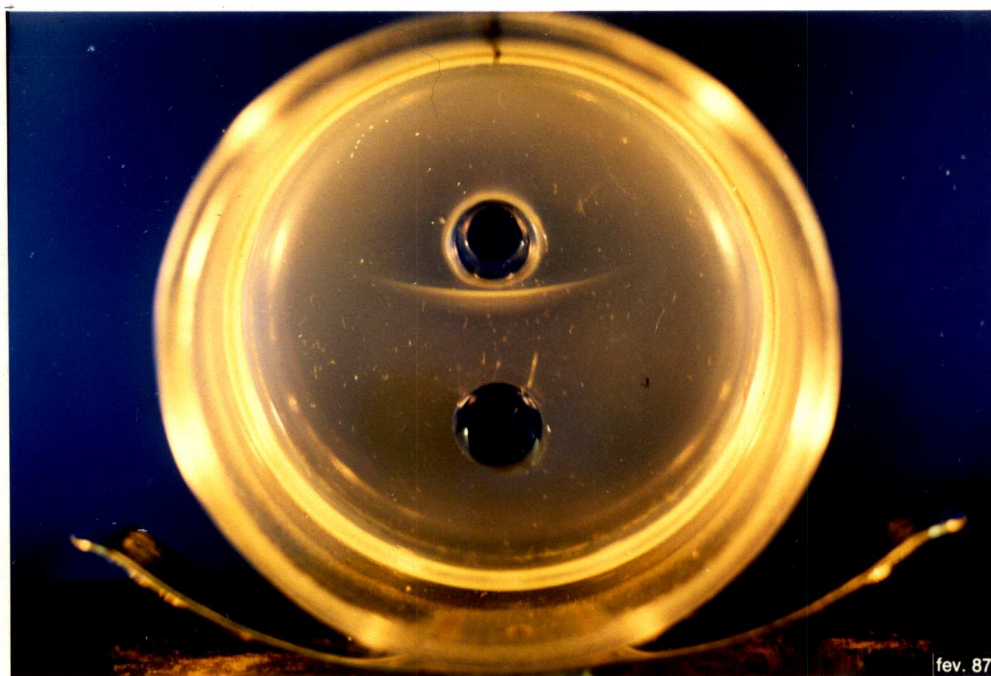


Abcissa: Comprimento (mm)

Ordenada: Logarítmo do recíproco da diluição ($\times 10$)

FIGURA 8. Curvas para determinação dos títulos do soro do animal N^o 5 em diferentes dias após a última injeção.

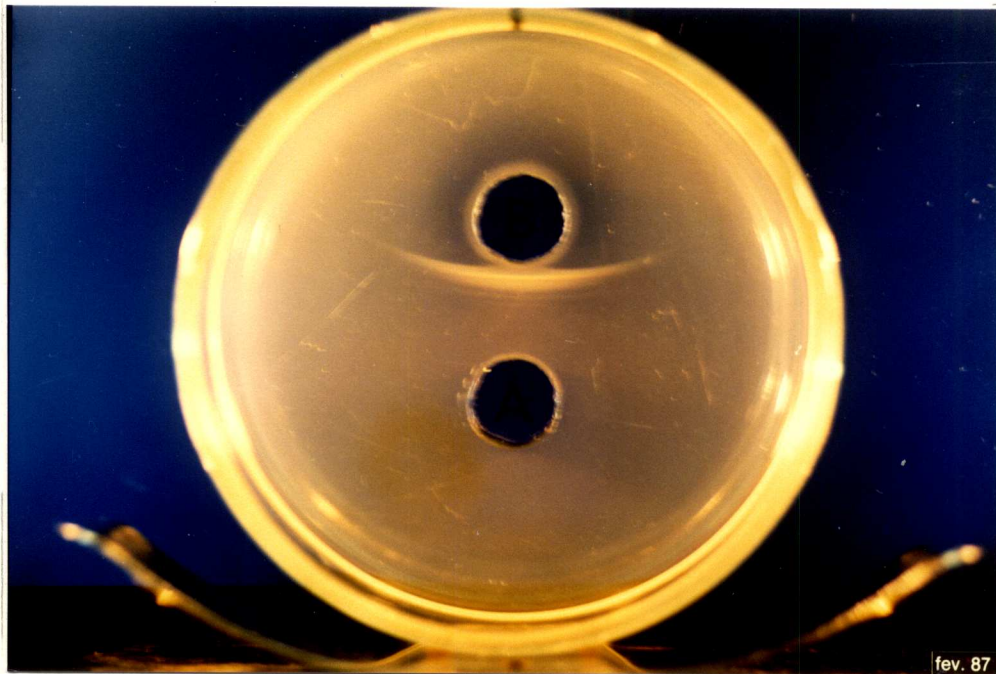
+ = 7; ◆ = 16; ▲ = 23 e ■ = 30 dias.



A=Sobrenadante

B=Soro

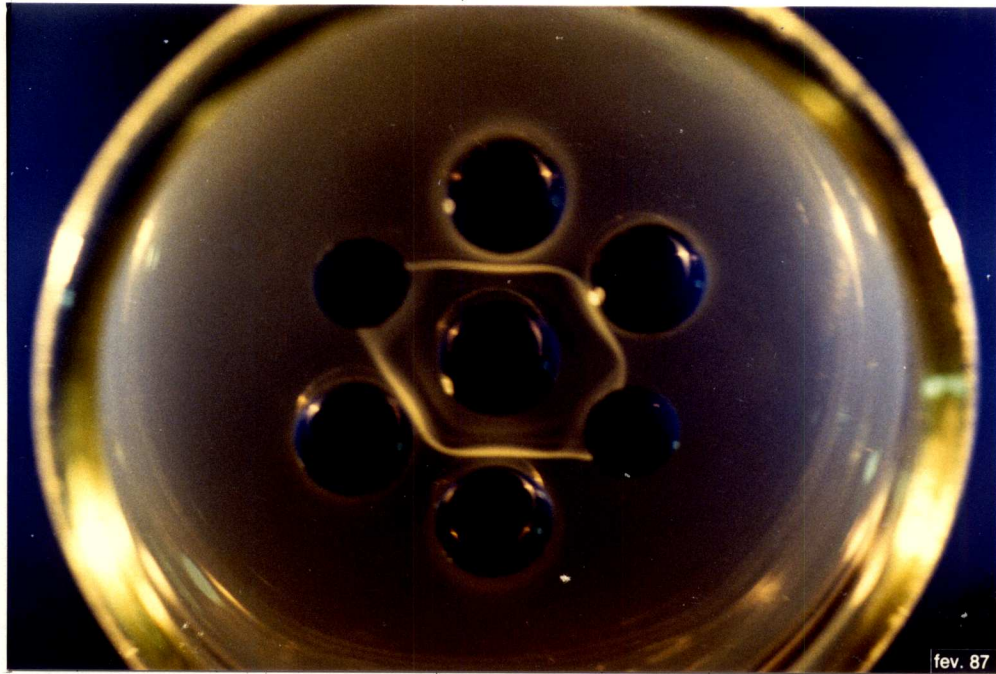
FIGURA 9. Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 3 contra sobrenadante da cultura de *Staphylococcus aureus* S-6 em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes.



A=Sobrenadante

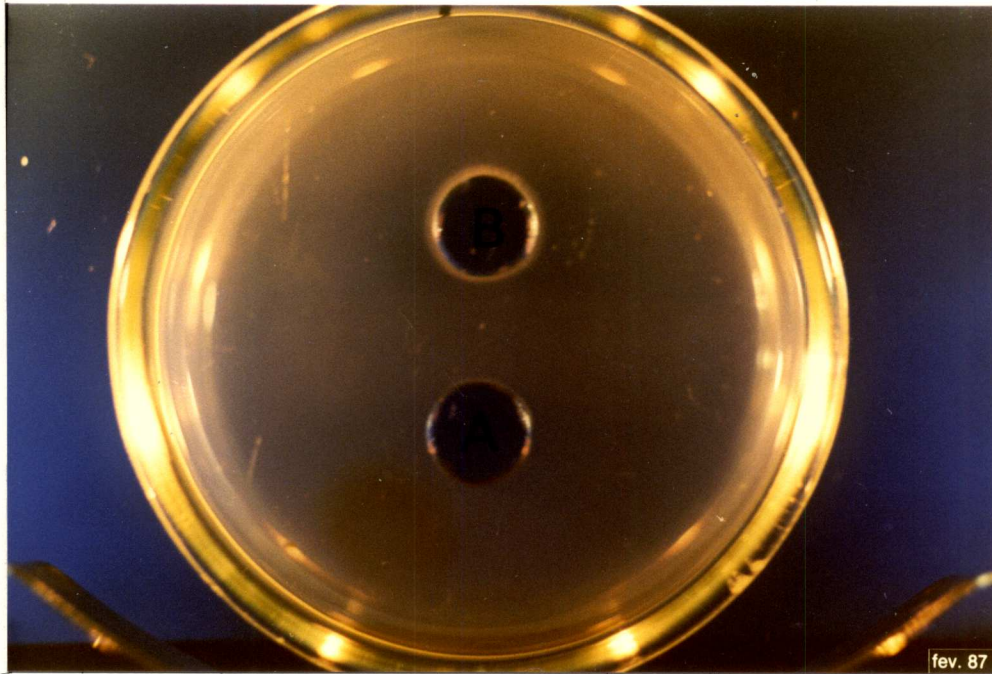
B=Soro

FIGURA 10. Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 5 contra Sobrenadante da cultura de *Staphylococcus aureus* S-6 em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes



A=Soro 3 B=Soro 3 diluído 1:2 C=Soro 5 D=Soro 5 diluído 1:2
E=Sobrenadante

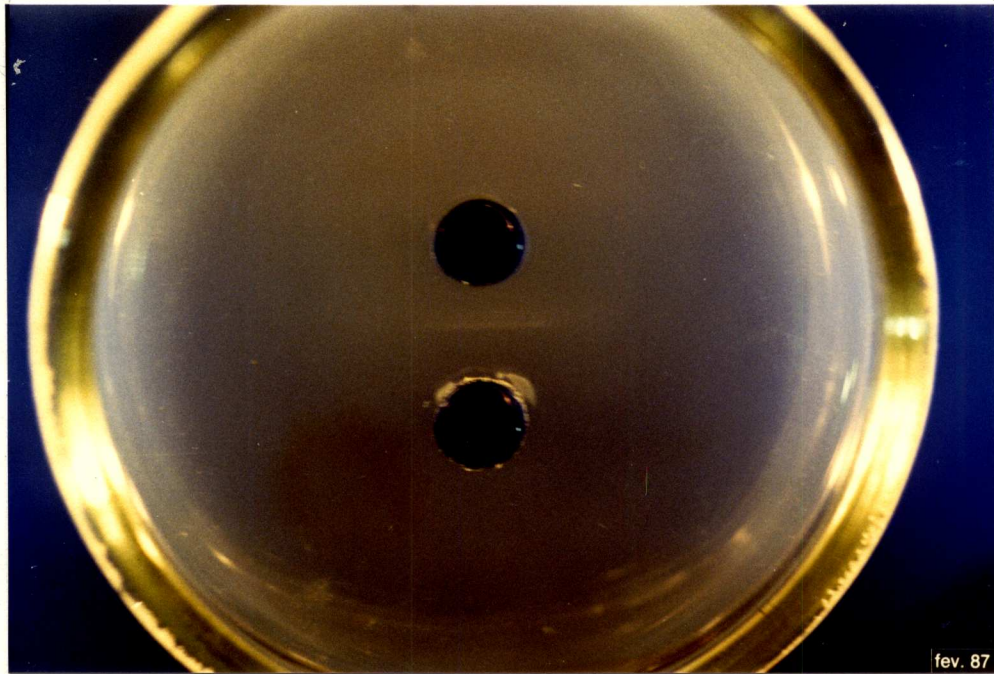
FIGURA 11. Dupla difusão em gel dos soros dos animais Nº 3 e 5 contra sobrenadante da cultura de *Staphylococcus aureus* S-6 em N-Z-Amine NAK.



A=Sobrenadante

B=Soro

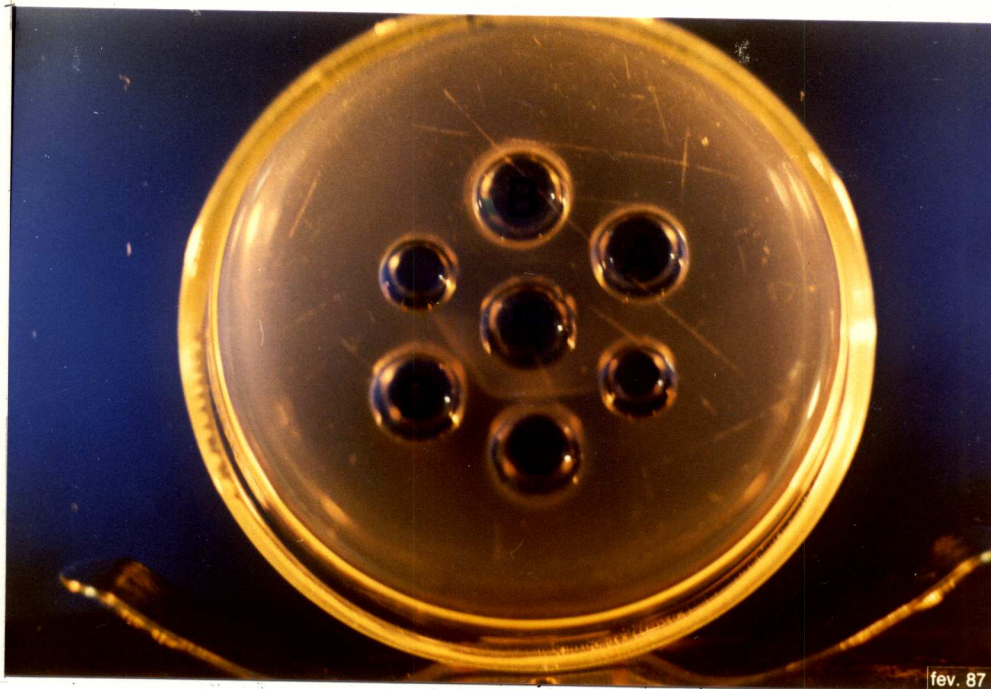
FIGURA 12. Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 3 contra Sobrenadante da cultura de *Staphylococcus aureus* S-184 em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes.



A=Sobrenadante

B=Soro

FIGURA 13. Dupla difusão em gel do soro do animal Nº 5 contra sobrenadante da cultura de *Staphylococcus aureus* S-184 em N-Z-Amine NAK, concentrado 3 vezes.



A=Soro 3 B=Soro 3 diluído 1:2 C=Soro 5 D=Soro 5 diluído 1:2
E=Sobrenadante

FIGURA 14. Dupla difusão em gel dos soros dos animais Nº 3 e 5
contra sobrenadante da cultura de *Staphylococcus*
aureus S-184 em N-Z-Amine NAK.