



T/UNICAMP
P414e
BCCL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ESTUDO DE PARÂMETROS REGULADORES DA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS TIPOS A E B PELA LINHAGEM S. aureus S-6

José Luiz Pereira
Eng. de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Sonia Presa Caggiani de Salzberg

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

AGRADECIMENTOS

O autor agradece sinceramente à Professora Doutora Sonia Presa Caggiani de Salzberg, pela orientação, apoio e amizade durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Merlin S. Bergdoll, do Food Research Institute, pelas valiosas recomendações e pelo suprimento de antígenos e antissoros gentilmente a nós cedidos.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela colaboração financeira que possibilitou a realização da presente pesquisa.

Ao pessoal técnico do laboratório de Microbiologia de Alimentos e a todos os demais que colaboraram direta ou indiretamente na realização do presente trabalho.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se o efeito de diferentes condições de cultura na produção das enterotoxinas estafilocócicas A e B, ambas produzidas pela linhagem S-6. Os resultados obtidos foram comparados com o comportamento de ambas as toxinas quando produzidas por linhagens distintas.

Os parâmetros estudados foram: temperatura de incubação entre 20 e 45°C, pH entre 4,5 e 9,0, cloreto de sódio (NaCl) de 0 a 12% e combinações de concentrações de NaCl e pH.

Como meio basal utilizou-se um hidrolizado de caseína suplementado com vitaminas e o método de cultura empregado, o de saco de celofane. A determinação e quantificação das enterotoxinas produzidas, foi realizada utilizando-se a técnica de simples difusão em gel. Para estudo da cinética de crescimento, empregou-se incubador gradiente de temperatura, determinando-se 39,4°C como temperatura ótima.

Obteve-se a máxima produção de enterotoxinas nas condições ótimas de crescimento, 39,4°C e pH 7,0, com valores de 230 µg/ml para B e 0,80 µg/ml para A. Após 12 a 15 horas de incubação, a velocidade de produção de enterotoxina A, atingiu o valor máximo. Este para a enterotoxina B, correspondeu a um tempo de incubação entre 18 e 24 horas. A produção de enterotoxina B foi de 30 a 300 vezes superior à de A, nas condições estudadas. A produção de ambas foi totalmente inibida a 20°C, acima de 45°C

pH 4,5 e a 12% de NaCl. Nas condições de 4% de NaCl, pH 6,0 e 37°C, não se detectou enterotoxina A, observando-se uma redução de 90% do valor máximo de B.

A síntese de ambas as toxinas foi afetada de maneira diferente nas condições de estudo. A produção de toxina B foi mais afetada que a de A, a temperaturas e valores de pH afastados dos ótimos e à concentrações salinas crescentes.

Estes resultados não apresentaram diferenças marcantes com os obtidos utilizando linhagens produtoras de uma única toxina.

SUMMARY

In this work we studied parameters that affected the production of enterotoxins A and B produced by the same microorganism (strain S-6). The obtained results were compared with the behavior of the enterotoxins when each one is produced by different microorganisms.

The parameters under study were incubation temperature between 20 and 45°C, pH between 4.5 and 9.0, sodium chloride between 0 and 12% and the combined effect of sodium chloride and pH.

The toxins were produced in a basic medium consisting of casein hidrolizate supplemented with vitamins by the sac culture technique. Toxins detection and quantification were performed by the single gel diffusion method. Growth culture studies were performed by the use of a gradiente incubator, the optimum growth temperature was determined to be 39.4°C.

The highest enterotoxin production was obtained at the optimum growth conditions that were 39.4°C and pH 7.0 with values 230.0 µg/ml for enterotoxin B and 0.80 µg/ml for A.

The velocity of production of enterotoxin A reached the maximum value during 12 to 15 hours incubation period. The corresponding interval for toxin B was 18 to 24 hours. Enterotoxin B production was 30 to 300 times higher than enterotoxin A production, at the studied conditions.

The production of both toxins was completely inhibited at 20°C, above 45°C, at pH 4.5 and 12% of sodium chloride. At the combined conditions of 4% sodium chloride, pH 6.0 and 37°C enterotoxin A was not detected and B was reduced by 90%.

The synthesis of each toxin was differently affected by the conditions under study. Toxin B production was more affected than A at temperatures and pH values far from the optimum and at increasing salt concentrations.

The results show no major differences with those obtained with single toxin producing microorganisms.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	13
INTRODUÇÃO	16
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
I.1. Histórico	18
I.2. Revisão Taxonomica da Espécie	18
I.3. Propriedades Fisiológicas e Bioquímicas	19
I.4. Caracterização de Enteropatogenicidade	21
I.5. Incidência de Intoxicação Alimentar	22
I.6. Enterotoxinas Estafilocócicas	23
I.6.1. Propriedades físico-químicas	23
I.6.2. Purificação das enterotoxinas	25
I.6.3. Ação e dose emética das enterotoxinas ..	25
I.6.4. Identificação das enterotoxinas estafilo cócicas	27
I.6.5. Produção de enterotoxinas	29

	Página
I.6.6. Fatores que afetam a produção de enterotoxinas estafilocócicas	31
II. MATERIAL	35
II.1. Organismo	35
II.2. Meios de Cultura	35
II.3. Reagentes para Testes Bioquímicos Característicos e Diferenciais da Espécie	35
II.4. Enterotoxinas Estafilocócicas	36
II.5. Soluções Tampão	36
II.6. Equipamentos Especiais	36
III. MÉTODOS	38
III.1. Caracterização da Cultura	38
III.2. Testes Bioquímicos Aplicados	38
III.2.a. Teste de produção de coagulase	38
III.2.b. Teste de produção das enzimas desoxirribonuclease termo-sensível e termo-resistente	39
III.3. Estudo da Cinética de Crescimento da Linhagem de <u>S. aureus</u> S-6 em Meio NAK	40
III.3.a. Preparo do inóculo	40
III.3.b. Incubação e medidas de crescimento .	40

III.4. Produção e Caracterização das Enterotoxinas Estafilocócicas a Partir da Linhagem <u>S.aureus</u> S-6	41
III.4.a. Padronização do inóculo	41
III.4.b. Produção de enterotoxinas tipo A e B em meio NAK a 37°C, pelo método de cultura em saco de celofane	42
III.4.c. Preparo das amostras para análise de enterotoxinas	43
III.4.d. Análise qualitativa - Método de O.S.P. (Optimum Sensitive Plate) - modificação do método de Ouchterlony	43
III.5. Variações nas Condições de Cultura	44
III.5.a. Variação de temperatura de incubação	44
III.5.b. Variação dos valores de pH do meio	44
III.5.c. Variações da concentração salina do meio	45
III.5.d. Variações conjuntas na concentração salina e pH do meio	45
III.6. Preparo e Análise das Amostras	46
III.6.a. Preparo das amostras	46
III.6.b. Análise quantitativa das enterotoxinas. Método de Oudin	46

	Página
III.6.b.1. Preparo do agar	46
III.6.b.2. Revestimento dos tubos ..	47
III.6.b.3. Preparo do agar-soro-anti- toxina	47
III.6.b.4. Preparo das soluções de antígenos	48
III.6.b.5. Leitura das bandas de pre- cipitação e construção da curva padrão	48
III.6.b.6. Análise das amostras	48
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
IV.1. Caracterização da Cultura de <u>Staphylococcus au</u> reus S-6	50
IV.2. Estudo da Cinética de Crescimento	50
IV.3. Produção das Enterotoxinas A e B em Meio NAK a pH 7,0 e 37°C pelo Método de Saco de Celofane	50
IV.4. Estudo dos Parâmetros que Afetam a Produção das Enterotoxinas Estafilocócicas	51
IV.4.1. Estudo do efeito da temperatura de in- cubação na produção de enterotoxinas .	52
IV.4.2. Estudo do efeito de pH na produção de enterotoxinas	52

Página

IV.4.3. Estudo do efeito da concentração sali	
na na produção das enterotoxinas	53
IV.4.4. Estudo do efeito combinado de concentra	
ções salinas e pH na produção de ente-	
rotoxinas	53
IV.5. Considerações Gerais	54
V. CONCLUSÕES	56
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Determinação da temperatura ótima de crescimento de <u>S. aureus</u> S-6, utilizando-se incubador gradiente de temperatura, em meio NAK-4% a pH 7,0	66
TABELA 2 - Crescimento e produção de enterotoxinas estafilocócicas A e B em meio NAK-4%, a pH 7,0 e 37°C utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	67
TABELA 3 - Taxa de produção de enterotoxinas A e B por hora em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	68
TABELA 4 - Produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes temperaturas de incubação em meio NAK-4% e a pH 7,0, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	69
TABELA 5 - Produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes valores de pH em meio NAK-4% e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6 .	70
TABELA 6 - Produção de enterotoxina B (EEB) a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4% a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u>	

S-6	71
-----------	----

TABELA 7 - Produção de enterotoxina A (EEA) a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4%, a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	72
--	----

TABELA 8 - Produção de enterotoxina B (EEB) sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4% a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	73
--	----

TABELA 9 - Produção de enterotoxina A (EEA) sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4% a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	74
--	----

TABELA 10- Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes temperaturas em meio NAK-4% e pH 7,0, após 72 horas de incubação, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	75
--	----

TABELA 11- Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes valores de pH, em meio NAK-4% a 37°C, após 72 horas de	
---	--

incubação, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	76
---	----

TABELA 12 - Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, após 72 horas de incubação, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	77
--	----

TABELA 13 - Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4%, a 37°C, após 72 horas, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	78
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Curva padrão para crescimento da linhagem <u>S. aureus</u> S-6, utilizando-se meio NAK-4%, pH 7,0 e a 37°C	79
FIGURA 2 - Curva padrão para determinação de enterotoxina estafilocócica tipo B, utilizando-se antissoro na diluição de 1:20	80
FIGURA 3 - Curva padrão para determinação de enterotoxina estafilocócica tipo A, utilizando-se antissoro na diluição de 1:20	81
FIGURA 4 - Curva de Arrhenius	82
FIGURA 5 - Crescimento e produção de enterotoxinas estafilocócicas A e B (EEA e EEB) em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	83
FIGURA 6 - Taxa de produção de enterotoxinas B por hora em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	84
FIGURA 7 - Taxa de produção de enterotoxina A por hora em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se	

a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	85
FIGURA 8 - Produção de enterotoxina B, a diferentes temperaturas de incubação em meio NAK-4% e a pH 7,0, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6 .	86
FIGURA 9 - Produção de enterotoxina A, a diferentes temperaturas de incubação em meio NAK-4% e a pH 7,0, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6 .	87
FIGURA 10 - Produção de enterotoxina B, a diferentes valores de pH em meio NAK-4% e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	88
FIGURA 11 - Produção de enterotoxina A, a diferentes valores de pH em meio NAK-4% e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	89
FIGURA 12 - Produção de enterotoxina B, a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4% a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	90
FIGURA 13 - Produção de enterotoxina A, a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4% a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	91

FIGURA 14 - Produção de enterotoxina B, sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4% a 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	92
FIGURA 15 - Produção de enterotoxina B, sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4% e 37°C, utilizando-se a linhagem <u>S. aureus</u> S-6	93
FIGURA 16 - Análise qualitativa de enterotoxinas, pelo método de O.S.P. (Optimum Sensitive Plate) - modificação do método de Ouchterlony	94
FIGURA 17 - Análise quantitativa de enterotoxinas, pelo método de Oudin	95

INTRODUÇÃO

Muitas linhagens de Staphylococcus aureus produzem proteínas extracelulares denominadas enterotoxinas. Estas toxinas são responsáveis por sintomas como as náuseas, vômitos e às vezes diarreia. Envenenamento alimentar pode ser provocado pela ingestão de pelo menos uma das cinco enterotoxinas estafilocócicas, imunologicamente diferentes, designadas por letras de A até E. De modo geral, as linhagens produtoras de enterotoxina B raramente estão relacionadas aos surtos de intoxicação alimentar, ao contrário das produtoras de A com frequência implicadas em grande número de casos.

Nas culturas de laboratório, paradoxalmente, a produção de enterotoxina A é muito menor que a de B, independentemente da linhagem e das condições de cultura.

Os requisitos para a secreção das toxinas não são claros, confundem-se com outras características fisiológicas da linhagem, como duplicação e crescimento. Torna-se assim difícil esclarecer se o comportamento é devido às características peculiares de síntese da enterotoxina em questão, ou se a todo o conjunto de particularidades bioquímicas intrínsecas à cada linhagem. Por estes motivos, tem havido certa preocupação por parte de vários pesquisadores em encontrar novas técnicas de trabalho, como por exemplo, a utilização de culturas submetidas a tratamentos que impeçam a divisão celular, sem no entanto pre

judicar a síntese das enterotoxinas.

A dificuldade de conseguir-se linhagens produtoras de mais de uma toxina em concentrações adequadas, para sua determinação por métodos convencionais, tem sido um dos fatores limitantes à avaliação dos diferentes parâmetros ligados à produção destes metabólitos.

Outra dificuldade adicional é a sensibilidade diversa do método de determinação utilizado.

Neste trabalho empregou-se a linhagem S. aureus S-6, produtora das enterotoxinas A e B, objetivando a comparação dos aspectos da produção de ambas as toxinas, independentemente das características bioquímicas e fisiológicas da cultura. A escolha dos parâmetros para estudo - temperatura de incubação, pH, concentração salina e combinação entre eles, obedecem a condições comumente observadas na indústria de alimentos.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1. HISTÓRICO

Segundo Davis (20), KOCH em 1878 foi o primeiro a descrever estafilococos em exsudatos purulentos de origem humana, dois anos após, PASTEUR cultivou o microrganismo em meio líquido e no ano seguinte OGSTON na Escócia demonstrou a patogenicidade do mesmo inoculando-o em camundongos e cobaias. ROSEMBACH em 1884, descreveu duas espécies denominadas Staphylococcus pyogenes aureus e Staphylococcus pyogenes albus, atualmente denominados por S. aureus e S. epidermidis.

Durante o ano de 1884, registraram-se 300 casos de graves distúrbios digestivos em Michigan, U.S.A., atribuídos ao consumo de queijos do tipo "Cheddar" (68), contaminados por S. aureus.

O primeiro surto bem documentado, com identificação de estafilococos como agente enterotoxinogênico data de 1914, envolvendo também alimentos derivados de leite (4).

I.2. REVISÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE

De acordo com a 8ª edição do "Manual de Bergey" (14) ambas as espécies S. aureus e S. epidermidis, pertencem ao gênero Staphylococcus, inserido na família Micrococcaceae. O nome staphylococcus, derivou do grego (staphyle = "cachos de u-

vas") (20), e descreve o aspecto dos microrganismos em esfregaços provenientes de meio sólido. Quando cultivados em meio líquido o aspecto é o de cadeias curtas.

A família Micrococcaceae é composta pelos gêneros, Staphylococcus, Micrococcus e Planococcus. Os dois primeiros apresentam o arranjo característico em cachos e o último em tétrades de cocos. A diferenciação entre Staphylococcus e Micrococcus baseia-se na capacidade de fermentação da glicose em anaerobiose (3).

I.3. PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Os estafilococos são microrganismos imóveis, não formadores de esporos, com diâmetro variável de 0,7 a 1,2 μ , os cocos de cepas patogênicas tendem a ser ligeiramente menores - que células de linhagens não patogênicas. São Gram-positivos, porém em culturas velhas podem aparecer células isoladas Gram-negativas. O crescimento em cachos é o resultado de divisões irregulares, em dois planos perpendiculares.

Os estafilococos são anaeróbios facultativos, não fotossintéticos e fortemente catalase positivo. Formam colônias circulares e convexas, de superfície lisa ou ligeiramente rugosa com bordas regulares ou levemente irregulares, apresentando coloração branca, de diferentes tonalidades de amarelo e laranja. Os estafilococos são mesófilos, crescendo melhor em condições aeróbicas na faixa de temperatura entre 37 a 43°C (66). A temperatura ótima de crescimento, situa-se entre 40 e 42°C (71).

Com respeito ao pH, o ótimo localiza-se ao redor de 7,0 a 8,5 (38), havendo desenvolvimento porém dentro da faixa de 4,9 a 9,4 (20).

Os membros deste gênero necessitam de 14 aminoácidos, como fonte de nitrogênio e algumas vitaminas como fatores de crescimento, em meios de composição definida (20). Crescem bem em meios complexos como o "Brain Heart Infusion" (infusão de cérebro e coração) e hidrolisados proteicos. A maioria das linhagens crescem e desenvolvem-se na presença de sais, até 15% de NaCl (34), ou 40% de sais biliares. A atividade mínima de água é de 0,83 a 0,86 (37,57,65).

De modo geral, as linhagens de estafilococos patogênicos, apresentam grande tolerância aos sais, como o cloreto de lítio, o telurito de potássio, os cianetos e azida sódica, assim como aos antibióticos como a polimixina e penicilina (61).

Grande número de métodos são utilizados para a identificação e isolamento de estafilococos, diferindo geralmente na natureza do(s) agente(s) seletivo(s) utilizado(s), sendo os principais as altas concentrações de cloreto de sódio e sais de telurito (61).

Um dos meios de isolamento mais amplamente utilizado, é o de Baird-Parker (61). Ele consiste em meio básico de agar que se adiciona na solução de gema de ovo e agentes inibidores e seletivos. Neste meio, o microrganismo utiliza as lipoproteínas, como a lipovitelina do ovo, resultando a formação de

estreito halo claro de difícil visualização ao redor das colônias. A posterior precipitação de compostos formados por sais de cálcio e magnésio e ácidos graxos liberados, forma ao redor deste halo, uma área opaca de coloração amarela mais acentuada, que na sua periferia progressivamente se confunde com a coloração do meio de cultura.

I.4. CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROPATOGENICIDADE

Muitas linhagens de Staphylococcus aureus, quando cultivadas em meios e condições apropriadas, produzem metabólitos tóxicos ao homem e animais, entre os quais hemolisinas, - leucocidinas, enzimas lipolíticas, fosfatases, coagulase, desoxirribonucleases, etc. (20,43). Esses metabólitos são importantes para a caracterização do poder invasivo do microrganismo no hospedeiro, podendo produzir como consequência, desde simples abscessos até infecções sistêmicas graves (2).

Do aspecto alimentar, a produção de enteroxinas por si, determina a patogenicidade da cepa.

Muitas características fisiológicas das culturas dos estafilococos são tidas como indicadoras de sua enterotoxigenicidade. Delas as mais amplamente aceitas são a produção das enzimas coagulase e desoxirribonuclease termo-resistente (18) (68). A enzima coagulase, parece ser característica do gênero Staphylococcus (20). Esta enzima causa a coagulação do plasma citratado ou oxalatado de coelho e humano (5,18). As enzimas de

soxirribonucleases que hidrolisam os ácidos nucleicos apresentam-se em duas formas, uma termo-sensível e outra termo-resistente (59,60).

I.5. INCIDÊNCIA DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR

Por serem os estafilococos parasitas dos animais, e o seu "habitat" natural a pele e mucosas, os alimentos podem ser facilmente contaminados pela manipulação durante o seu processamento industrial (44).

Surtos de intoxicação por estafilococos tem se produzido pelo manuseio dos alimentos por portadores de infecções cutâneas de origem estafilocócica (30).

Os surtos em geral apresentam-se isolados, envolvendo grupos de pessoas relacionadas em refeições coletivas, banquetes, etc. Visto que poucos são os casos em que ocorre intervenção clínica, há dificuldade considerável na localização, identificação e controle do surto (30).

Outro reservatório destes microrganismos é o gado bovino acometido de mastite. O leite oriundo de vacas portadoras desta enfermidade apresenta contagens altas de estafilococos, aptos a crescerem e eliminarem compostos enterotoxinogênicos.

Os estudos epidemiológicos apresentam falhas motivadas por falta de registros de casos comprovados, espaço de tempo curto tanto para manifestação da sintomatologia típica, co

mo para o restabelecimento das pessoas acometidas de intoxicação alimentar estafilocócica (53).

Alguns dos alimentos implicados em intoxicações estafilocócicas são produtos de confeitaria, carnes e derivados, produtos lácteos e principalmente, refeições prontas para consumo, tão comuns hoje em dia.

Os fatores básicos para o desenvolvimento de estafilococos são: composição química, pH, presença de outros microrganismos, condições e métodos de processamento em geral, distribuição e consumo dos alimentos. Os três últimos determinam, até certo ponto, o grau de contaminação do alimento por manipuladores ou condições ambientais (2,30,53).

I.6. ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

I.6.1. Propriedades físico-químicas

Por serem as enterotoxinas metabólitos de excreção, a ausência de estafilococos num alimento, não é condição suficiente para o considerarmos apto ao consumo, visto que os metabólitos podem ter sido excretados na fase anterior à destruição dos microrganismos pelos processos de elaboração do produto, permanecendo inalteradas as suas características enterotoxinogênicas.

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular (26000 a 35000) (11). Quando purificadas, a

presentam-se como compostos de aparência flocosa, muito higroscópicas e facilmente solúveis em água ou soluções salinas.

No momento são conhecidos seis tipos de enterotoxinas, denominadas por A, B, C₁, C₂, D e E. A base da diferenciação entre elas é a propriedade de apresentarem reações sorológicas específicas (8,17).

A composição de aminoácidos das enterotoxinas é semelhante, predominando a lisina, a tirosina, o ácido aspártico e o glutâmico e contando somente um ou dois resíduos de metionina. Estes últimos formam uma ligação cruzada, evidenciada pela ausência de grupos SH- livres na molécula. Este tipo de ligação, proporciona o aparecimento de uma alça contendo diversos resíduos de aminoácidos que variam nas diferentes toxinas. Alguns autores sugerem que nesta porção da molécula esteja localizada a atividade tóxica e antigênica da proteína (11).

As enterotoxinas no estado ativo, são altamente resistentes à ação de enzimas proteolíticas, como a tripsina, quimotripsina, renina e papaína, podendo ser destruídas pela pepsina a pH 2,0, mas não o sendo acima deste valor (9). Também apresentam apreciável resistência térmica. Estudos feitos com a enterotoxina A, mencionados por vários autores (8), nos relatam que a toxina bruta, ou seja, não purificada, à concentração de 21 µg/ml e pH 7,2, requer um aquecimento a 100°C por 130 minutos para reduzir a concentração abaixo de 1 µg/ml (29). As enterotoxinas podem ser inativadas pelo processamento usado para

alimentos enlatados, entretanto, simples pasteurização ou secagem pelo processo de "spray-drying", não as inativam (8).

Alguns autores tem demonstrado que o aquecimento da toxina B a 60, 80 e 100°C, na presença de proteínas da carne, resulta numa rápida perda de enterotoxigenicidade, perda esta relacionada à combinação entre ambas (55). As enterotoxinas purificadas são mais sensíveis ao aquecimento que as preparações brutas (8).

I.6.2. Purificação das enterotoxinas

Em 1965 alguns pesquisadores do Food Research Institute, descreveram um procedimento baseado em técnicas de extração em colunas cromatográficas, por meio das quais as enterotoxinas puderam ser parcialmente purificadas (7,43). As etapas principais do processo de purificação podem ser descritas resumidamente como: a) concentração do sobrenadante da cultura, de 10 a 20 vezes, com Carbowax-20M, seguida de diálise; b) adsorção com CM-celulose à diferentes concentrações de tampão fosfato, seguida por eluições em concentrações gradientes de tampão; c) diálise, liofilização e ressuspensão dos eluidos; d) filtração através de colunas de Sephadex G-75 e G-50. A porcentagem de pureza após este processo é de 35 a 40% (56).

I.6.3. Ação e dose emética das enterotoxinas

O quadro clínico apresentado por indivíduos que

tenham ingerido enterotoxinas estafilocócicas é de período - curto de incubação, de duas a seis horas, com início abrupto, - caracterizado por salivação, náuseas, vômitos incoercíveis, cólicas abdominais e diarreia. Sintomas secundários como dores musculares, de cabeça e febre podem aparecer. A enfermidade é aguda e auto-limitada com completo restabelecimento entre 24 a 72 horas (8).

As enterotoxinas estafilocócicas, quando ingeridas por adultos sadios e normais, produzem manifestações clínicas leves. No caso de pessoas debilitadas, como doentes, idosas ou crianças pequenas, as vezes se instalam quadros clínicos mais graves que requerem cuidados especiais - (33).

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

Através de estudos em animais de laboratório, macaco rhesus e macaco mulata, concluiu-se que o vômito é provocado por estimulação de receptores eméticos localizados no trato gastrintestinal, e transmitido ao centro do vômito via vago e

nervos simpáticos (8). A diarreia induzida pelas enterotoxinas, tem sido atribuída à inibição da absorção da água da luz intestinal, ou ao aumento no fluxo transmucoso de líquidos para esta luz (8).

Estudos com voluntários, mostram que 20 a 25 μ g de enterotoxina B pura, ou seja, 0,4 μ g/kg de peso corporal, podem provocar quadros clínicos típicos de intoxicação alimentar. Os seres humanos são mais sensíveis à ação das enterotoxinas que macacos, que respondem apenas as doses acima de 0,9 μ g/kg - (51).

I.6.4. Identificação das enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas quando ministradas à animais de laboratório, como cobaias, camundongos, coelhos, galinhas, etc., provocam uma resposta imunológica por parte do organismo receptor, com a formação de anticorpos específicos. Pela primeira vez por volta de 1938, alguns pesquisadores, reconheceram a antigenicidade das enterotoxinas (44), pela utilização de macacos e galinhas, ministrando injeções subcutâneas de filtrados de culturas estafilocócicas. Posteriormente foi observada a reação de antígeno e anticorpo em meio de agar, identificando uma série de antígenos na preparação de enterotoxinas. A partir disso, começaram a ser utilizados métodos sorológicos para evidenciar enterotoxinas estafilocócicas e somente por volta de 1965 é que

tais métodos foram inseridos na rotina laboratorial de análise de enterotoxinas (15).

No campo da imunologia e sorologia, existem diversos tipos de reações amplamente utilizadas na tipificação e quantificação de moléculas antigênicas. Algumas das quais são a precipitação específica, a aglutinação, a opsonização, a imunofluorescência e a fixação de complemento (13). As mais amiúde usadas na determinação e dosagem de enterotoxinas estafilocócicas, são as genericamente denominadas reações de precipitação específica e imunofluorescência, uma vez que são empregadas para antígenos e anticorpos solúveis. No caso das reações de aglutinação e opsonização, estão implicadas estruturas mais complexas como, células, partículas inertes e antissoros multivalentes (13).

Entre as técnicas de demonstração de reações de precipitação específica, as mais empregadas são as de difusão - em gel de agar ou agarose (12,32), ou seja a imunodifusão dupla (6,49), imunodifusão simples (50,58), e a imunomicrodifusão (16).

O método de dupla difusão em gel, ou em duas dimensões, conhecido como método de Ouchterlony, consiste na difusão de soluções de antígenos e antissoros, distribuídos em orifícios distintos, em placa recoberta com agar. Ao entrarem em contacto os reagentes específicos, ocorre a reação visualizada por linhas de precipitação no seio do gel. A sensibilidade deste método está entre 5 a 10 μ g/ml de enterotoxina (8).

A difusão simples em gel ou método de Oudin, é uma técnica quantitativa, amplamente utilizada nos diversos estudos com enterotoxinas estafilocócicas (36,47,52,70). Esta técnica utiliza tubos de tamanho padrão, contendo um gel de agar com concentrações convenientes de antissoro, ao qual é adicionada a solução de antígenos. Esta difunde-se através da coluna de agar, formando bandas de precipitação, que são medidas e comparadas com uma curva padrão, antes preparada com soluções de antígenos puros de concentrações conhecidas.

Os métodos de simples e dupla difusão são utilizados quando a concentração de antígenos no extrato a ser analisado for superior a $1\mu\text{g/ml}$. Para concentrações inferiores a esse valor, empregam-se métodos como o de difusão simples em tubos capilares (24,25), e o de microdifusão dupla em lâminas (10), que apresentam uma sensibilidade aproximada de $0,1\mu\text{g/ml}$.

I.6.5. Produção de enterotoxinas

Vários autores (35,36,52,54) sugeriram diferentes métodos e meios de cultura para a produção de enterotoxinas estafilocócicas.

A utilização de meios derivados de hidrolisados proteicos são os recomendados (35,52). Entre estes, citam-se o meio PHP (Protein Hydrolysate Powder) e o meio N-Z Amine NAK, isolados ou combinados em diversas concentrações e suplementados com 0,00005% de tiamina e 0,01% de niacina (36,69).

A escolha do meio para a produção de enterotoxinas é crítica, segundo a literatura pesquisada. Os estudos mostram que a produção de enterotoxinas é muito afetada pela composição dos diferentes meios. Assim, o meio BHI (Brain Heart Infusion) é inferior quando comparado aos meios N-Z Amine NAK 4%, ou NAK 3% mais PHP 3%, nas condições iniciais de pH 5,3 e 6,8, temperatura de 37°C e agitação, na produção de enterotoxinas A, B e C (52).

Estudos feitos com respeito às necessidades nutricionais de S. aureus S-6, revelaram que o meio mínimo, quimicamente definido, para a produção de níveis demonstráveis de enterotoxina é composto de glutamato monossódico que atua como fonte de carbono, nitrogênio e energia, aminoácidos essenciais, a saber, arginina, cistina e fenilalanina, seis sais orgânicos e quatro vitaminas (42,69).

Quando se utiliza glicose como fonte de carbomo é necessário suplementar o meio com os aminoácidos prolina e valina.

A análise rotineira de enterotoxinas, requer culturas concentradas de maneira que o sobrenadante possa ser testado corretamente. Para este fim, muitos pesquisadores usam técnicas de produção em meios de cultura sólidos, recobertos por celofane (35) e culturas em sacos de celofane (31,54).

O método de cultura em frascos sob agitação (36) empregado para a produção de enterotoxinas para fins de purificação

ção, está sendo atualmente substituído pelo método de fermentação contínua*.

A relação entre síntese de enterotoxina e crescimento microbiano é motivo de controvérsias por parte de vários autores. Segundo alguns, uma alta produção de enterotoxinas é acompanhada de abundante crescimento e, quando este for prejudicado quer por alterações nas condições de cultura quer por aditivos, a síntese também será afetada (27,31,63). Entretanto, um bom crescimento, não é necessariamente acompanhado de alta produção de enterotoxinas. Este fato pode ser observado pelos estudos com meios sintéticos nos quais a produção de enterotoxina B acompanhou paralelamente o crescimento celular, até que alguns aminoácidos fossem completamente utilizados. A partir desse instante, o crescimento continuou por várias horas, o que não ocorreu com a produção de enterotoxinas (19).

I.6.6. Fatores que afetam a produção de enterotoxinas estafilocócicas

Os principais fatores que interferem com a síntese de enterotoxinas estafilocócicas em laboratório são: a presença de inibidores nos meios de cultura, pH, temperatura de incubação, taxa de aeração, presença de outros microrganismos, -

* Bergdoll, M. S. - informação pessoal.

etc. (21,41).

Com respeito as substâncias inibidoras presentes no meio, podemos citar: cloreto de sódio, cloranfenicol, tween 80, ácido oleico, deoxicolato de sódio, penicilina, D-cicloserina e bacitracina (22,23). Das substâncias mencionadas, o cloreto de sódio é de grande importância, uma vez que é amplamente utilizado em processamento de alimentos, como preservativo natural.

A produção de enterotoxinas B e C é muito afetada pelo pH maior a pH 6,8 () di-
minuindo para valores de pH menores. A produção de enterotoxina A é menos sensível às variações de pH (52) e praticamente constante dentro do intervalo de 5,3 a 7,0 (40).

A síntese de enterotoxina B, segundo alguns pesquisadores apresenta um aumento acima de pH 6,4, e considerável diminuição abaixo dele (47).

A adição de sais como cloreto de sódio, afetam grandemente a produção das enterotoxinas quer pelo efeito inibidor dos seus íons quer pela diminuição da atividade de água (aw) no meio de cultura. O abaixamento de aw de 0,99 a 0,98 ou 0,97 resulta em níveis muito baixos de produção de toxina, apesar de não comprometer de maneira apreciável o crescimento (63,64).

Outros estudos nos mostram que concentrações de 10% de NaCl tem pouca influência no crescimento de S. aureus, porém a níveis pouco maiores que 3%, o decréscimo na produção de

toxinas é evidente (45).

A ação conjunta de NaCl, pH e temperatura é largamente utilizadas em estudo de inibição da síntese de enterotoxinas (62). De acordo com alguns autores, o S. aureus é capaz de crescer em caldos contendo 12% de NaCl a temperaturas entre 20 e 35°C. Nestas condições a produção de enterotoxina B é inibida. Todavia a produção continua se a concentração de NaCl for inferior a 4% (64).

Outros trabalhos realizados nas condições de pH 6,9 e 10% de NaCl, e pH 5,1 e 4% de NaCl, mostram que pode ocorrer a produção de enterotoxina B (27).

A adição de glicose ao meio de cultura, também interfere com a síntese de enterotoxina B, não só pela diminuição do pH, devido ao metabolismo de fermentação, como também pela ação inibitória de compostos intermediários (45,46).

Com respeito à temperatura, alguns autores sugerem temperaturas ao redor de 40°C, como ótimas para a produção de enterotoxina B em meios de cultura (66), contrariando outros que situam a produção máxima a 37°C (52).

Os autores discordavam, até a algum tempo, quanto às taxas de produção das enterotoxinas A e B. Segundo alguns, o início da síntese de enterotoxinas A e B ocorria em tempos diferentes. Assim a enterotoxina A seria produzida continuamente pelas células durante a fase exponencial de crescimento, e a B somente a partir da fase transitória entre o final do crescimen

to exponencial e começo da fase estacionária.

Por isso essas enterotoxinas foram caracterizadas como metabólitos primário e secundário respectivamente (39,40).

Este conceito contudo não deve persistir pois trabalhos posteriores, mostraram que a síntese de ambas as enterotoxinas, ocorre durante todas as fases de crescimento bacteriano, porém com diferentes velocidades de produção. Estes resultados - foram confirmados pelo emprego de técnicas de determinação com limites de sensibilidade superiores aos anteriormente utilizados (19).

II. MATERIAL

II.1. Organismo: Staphylococcus aureus S-6, fornecido por M. S. Bergdoll, do Food Research Institute (FRI), Universidade de Wisconsin, Madison, U.S.A.

II.2. Meios de Cultura

II.2.1. Meio de enriquecimento seletivo: infusão de cérebro e coração Difco, suplementado com 10% de NaCl (BHI+10% NaCl) (61).

II.2.2. Meio seletivo: meio modificado de Baird-Parker Difco, adicionado de Bacto EY (telurito e gema de ovo) (61).

II.2.3. Meio para produção de enterotoxinas: meio N-Z Amine NAK (digerido pancreático de caseína), Sheffield Chemical Co., suplementado com tiamina (0,00005%) e niacina (0,01%) (36,69).

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

II.3.1. Reativos para coloração de Gram, pelo método modificado de Hucker (1).

II.3.2. Plasma liofilizado de coelho Difco, para

determinação de enzima coagulase.

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

Composição do meio (5):

DNA (Difco)	0,3 g
Agar (Difco)	10,0 g
CaCl ₂ 0,01M	1,0 ml
NaCl	10,0 g
Azul de toluidina 0,1M	3,0 ml
Tampão Tris 0,05M a pH 9,0	q.s.p. 1000 ml

II.4. Enterotoxinas estafilocócicas, parcialmente purificadas, tipos A e B e seus respectivos antissoros cedidos por M. S. Bergdoll (FRI).

II.5. Solução de tampão fosfato salino (PBS) 0,02M, pH 7,4; solução de NaOH 0,1N e solução de HCl 0,1N.

II.6. Equipamentos especiais

II.6.1. Incubador "shaker" com temperatura controlada Modelo G-25, New Brunswick, Scientific Industries Co. Inc. New Jersey, U.S.A.

II.6.2. Incubador de temperatura gradiente, Scien

tific Industries Co. Inc., New Jersey, U.S.A, equipado com tubos de vidro especiais em forma de "L" (17 mm de diâmetro e 170 mm de comprimento).

II.6.3. Spectrofotômetro "Bausch and Lomb", Spectronic 20, com adaptador para operar com tubos de 20 mm de diâmetro externo. Comprimento de onda utilizado, 600 nm.

II.6.4. Potenciômetro de pH, Corning Digital 110, de escala expandida e resolução de 0,01 pH (0,001 pH expandido).

II.6.5. Banho termostático de temperatura controlada "Fanem", Modelo 120/2 de 110V e 1000KW.

II.6.6. Centrífuga refrigerada, Modelo IEC B-20A. International Equipment, U.S.A.

II.6.7. Liofilizador de bandeja Virtus. The Virtis Company, Modelo nº 10-146 MR-BA, Gardiner, N.Y.

II.6.8. Tubos de vidro com 4 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento para método de simples difusão em gel (tubos de Oudin).

II.6.9. Molde de acrílico O.S.P. (Optimun Sensitive Plate), modelo FRI, para teste de dupla difusão em gel.

III. MÉTODOS

III.1. Caracterização da cultura

As culturas recebidas foram ativadas em meio BHI mais 10% de NaCl (61) a 37°C, por 24 horas. A partir deste caldo assim obtido, inoculou-se por esgotamento placas com meio de Baird-Parker modificado (61).

Colônias típicas isoladas, pretas, brilhantes - com halo de transparência e precipitação, foram caracterizadas pela reação de Gram e testes bioquímicos.

As colônias selecionadas foram conservadas em meio BHI agar a 10°C e repicadas a intervalos de 60 dias para manutenção.

III.2. Testes bioquímicos aplicados

Para a realização dos testes bioquímicos de produção de coagulase e desoxirribonucleases, utilizaram-se culturas de 18 a 24 horas a 37°C em caldo BHI ou similar.

III.2.a. Teste de produção de coagulase

Plasma liofilizado de coelho, reconstituído com 3 ml de água destilada e dividido em porções de 0,4 ml em tubos de 0,5 mm de diâmetro, foi inoculado com 0,05 ml de cultura de densidade óptica (D.O.) de 0,30. A seguir os tubos foram incuba

dos a 37°C e observados com intervalos de uma hora, durante 4 horas e após 24 horas.

O resultado foi considerado positivo quando ocorreu coagulação do plasma, levando-se também em conta o tempo requerido para que ocorresse a reação.

III.2.b. Teste de produção das enzimas desoxirribonuclease termo-sensível e termo-resistente (5)

O princípio desta reação é a mudança de coloração azul apresentada pelo complexo agar-DNA-azul de toluidina, para coloração rósea, pela ação da enzima desoxirribonuclease, que hidrolisa o ácido desoxirribonucleico.

A reação foi realizada em lâminas de vidro previamente recobertas pela mistura agar-DNA-azul de toluidina. Este material foi preparado com antecipação e guardado em câmara úmida a 10°C. Imediatamente antes da realização do teste, foram feitos orifícios de aproximadamente 3 mm de diâmetro, dispostos em fileira dupla e distanciados 1 cm dos orifícios adjacentes. Culturas com 18 a 24 horas de incubação foram padronizadas para uma D.O. de 0,3 e divididas em duas partes, sendo uma aquecida em banho de água em ebulição, durante 20 minutos. Ambas foram inoculadas nas lâminas com o auxílio de uma pipeta "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 primeira observação foi realizada após 3 horas e a última após 24 horas.

III.3. Estudo da cinética de crescimento da linhagem de S. aureus S-6 em meio NAK.

III.3.a. Preparo do inóculo

Uma alçada de cultura proveniente de meio sólido foi semeada em tubo contendo meio BHI e este incubado a 37°C sob condições estáticas durante 18 a 24 horas. Desta cultura 5 ml foram inoculados em frasco Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio NAK e incubados sob agitação de 250 rpm a 37°C durante duas horas.

A semeadura foi feita transferindo-se 0,05 ml de inóculo (uma gota de micropipeta sorológica calibrada), padronizado a D.O. 0,5 em cada tubo do incubador de temperatura gradiente, contendo 10 ml de meio NAK.

III.3.b. Incubação e medidas de crescimento

O intervalo de temperatura foi ajustado entre 18 e 60°C, utilizando-se 18 tubos. Os tubos foram conectados ao incubador anteriormente à inoculação, com o propósito de estabilizar-se a temperatura do meio em cada um deles.

A incubação foi feita sob agitação recíproca na velocidade de 30 ciclos/minuto. O crescimento dos microrganismos

mos foi determinado pelo método turbidimétrico, utilizando-se - espectrofotômetro. As leituras de D.O., foram efetuadas a intervalos regulares de 15 minutos.

As curvas de crescimento foram obtidas, construindo-se gráficos com o logarítmo das D.O. em ordenadas e o tempo em minutos nas abscissas. As constantes específicas de crescimento (k), foram determinadas a partir das porções retilíneas de máximo declive nas curvas de crescimento, e calculadas pela expressão:

$$k = 2,303 (\log x_2 - \log x_1) / t_2 - t_1 \text{ min}^{-1}$$

onde, x_1 e x_2 foram os valores das D.O. nos tempos t_1 e t_2 respectivamente. A partir das constantes de crescimento, obtidas à diferentes temperaturas, foram traçadas as curvas de Arrhenius.

III.4. Produção e caracterização das enterotoxinas estafilocócicas a partir da linhagem S. aureus S-6

III.4.a. Padronização do inóculo

Um Erlenmeyer contendo 50 ml de meio NAK, foi inoculado com uma alçada de cultura de S. aureus S-6 proveniente do meio BHI agar. O frasco foi incubado sob agitação à 250 rpm, 37°C durante 18 a 24 horas.

Após a incubação a D.O. da cultura foi acertada, utilizando-se volumes conhecidos de meio NAK, a um valor entre

0,4 e 0,5. A partir desta suspensão efetuaram-se diluições e leram-se as respectivas D.O.

O número de microrganismos da suspensão original e subsequentes, foi determinado pelo método de diluições e plaqueamento. Como diluente foi utilizado o próprio meio NAK e o plaqueamento em meio BHI agar.

Com os valores obtidos, construiu-se a curva padrão correlacionando D.O. a número de microrganismos. Esta curva foi utilizada durante o decorrer dos experimentos subsequentes (Figura 1).

III.4.b. Produção de enterotoxinas tipo A e B em meio NAK a 37°C, pelo método de cultura em saco de celofane

Para a produção de enterotoxinas, foi escolhida a técnica de cultura em saco de celofane (54).

Um volume de 100 ml de meio NAK foi adicionado em tubo de celofane, do tipo utilizado em embutidos cárneos e similares, previamente fechado em uma das extremidades. Após a adição do meio, o tubo foi fechado e introduzido em Erlenmeyer de 300 ml, contendo 19 ml do mesmo meio. O conjunto fechado com tampão de algodão, foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Após a esterilização o meio foi esfriado à temperatura ambiente e inoculado com 1 ml de cultura padronizada, com

tendo 10^7 /ml microrganismos. Os frascos foram incubados em "shaker" rotatório a 250 rpm e 37°C durante 18 horas.

III.4.c. Preparo das amostras para análise de enterotoxinas

Terminada a incubação foram retiradas duas amostras de 10 ml cada, e centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C .

O sobrenadante foi dialisado contra água destilada a 4°C por 24 horas, com trocas de água a intervalos de 1 hora nas primeiras 6 horas.

Os dialisados foram a seguir liofilizados em placas de Petri envoltas em papel alumínio, em liofilizador de bandejas. Para a determinação de enterotoxina B, o liofilizado foi ressuscitado ao volume original com tampão PBS. Para a enterotoxina A, foi utilizado um volume correspondente a uma concentração de 5X a do volume original.

III.4.d. Análise qualitativa - Método de O.S.P.

(Optimun Sensitive Plate) - modificação do método de Ouchterlony (54,49)

O método de dupla difusão em gel, foi utilizado para a determinação qualitativa das enterotoxinas. Este procedimento utiliza placas de Petri com 80 mm de diâmetro, recobertas com 3 ml de agar Noble 1,2%, preparado com PBS e filtrado

a quente através papel Wattman nº 2, a vácuo.

Após a solidificação o agar foi perfurado, utilizando-se um molde padronizado (O.S.P.).

Ao orifício central da placa foi adicionado anti-soro, nos laterais (orifícios menores) os antígenos padrões e nps restantes as soluções a serem analisadas. O anti-soro B padrão foi adicionado na diluição de 1:20 e o anti-soro A na diluição de 1:12, e as enterotoxinas padrão na concentração de $4 \mu\text{g/ml}$.

As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 24 horas. Após este tempo observaram-se com luz indireta sob fundo de vidro escuro, visualizando-se linhas de precipitação ao redor do orifício central (Figura 16).

III.5. Variações nas condições de cultura

III.5.a. Variações de temperatura de incubação

Inoculou-se 21 frascos com a técnica referida no ítem III.4.b.e incubou-se em "shaker" rotatório a 250 rpm, sendo 3 frascos para cada temperatura de 20, 25, 30, 37, 39,5, 45 e 50°C .

As amostras foram retiradas após 18, 24, 48 e 72 horas de incubação.

III.5.b. Variações dos valores de pH do meio

A produção de enterotoxinas foi determinada nos seguintes valores de pH: 4,5; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0. Estes valores foram obtidos pela adição de soluções de NaOH 0,1N e HCl 0,1N ao meio de cultura.

Os meios inoculados como referido no item III.4.b, foram incubados a 37°C em "shaker" rotatório a 250 rpm, sendo - três cada valor de pH utilizado.

As amostras foram retiradas às 18, 24, 48 e 72 horas de incubação.

III.5.c. Variações da concentração salina do meio

Ao meio basal NAK, ^{foram} ~~foram~~ adicionadas as seguintes concentrações de NaCl: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 12% (p/v). Os frascos, sendo três para cada valor, foram inoculados como referido no item III.4.b. e incubados em "shaker" rotatório a 250 rpm.

As amostras foram obtidas após 12, 15, 18, 24, 48 e 72 horas.

III.5.d. Variações conjuntas na concentração salina e pH do meio

Foram testadas as seguintes combinações de concentração salina e pH: 1% NaCl, pH 6,0; 1% NaCl, pH 6,5; 2% NaCl pH 6,0; 2% NaCl, pH 6,5; 4% NaCl, pH 6,0 e 4% NaCl, pH 6,5.

Os frascos inoculados em número de três para ca-

da combinação, foram incubados como já descrito anteriormente e as amostras retiradas às 18, 24, 48 e 72 horas de incubação.

III.6. Preparo e análise das amostras

III.6.a. Preparo das amostras

Foram retirados 5 ml de cada frasco e divididos - em duas partes iguais, uma para determinação de enterotoxina A e outra para a de enterotoxina B.

As amostras foram tratadas pelo procedimento descrito no item III.4.c. Os volumes de tampão PBS utilizados foram, 2,5 ml para a amostra ressuspensa ao volume original e 0,5 ml para a amostra concentrada.

III.6.b. Análise quantitativa das enterotoxinas. Método de Oudin (28,36,47,50,52,58,70)

Este método é baseado na técnica de simples difusão em gel, utilizando-se tubos de Oudin contendo agar-soro-antitoxina.

III.6.b.1. Preparo do agar

Agar Noble na concentração de 0,6%, foi dissolvido e fundido em tampão PBS, a seguir filtrado a quente, utilizando-se papel de filtro Wattman nº 2, com auxílio de vácuo. O agar assim preparado foi estocado em geladeira em volumes de 25 ml a

proximadamente. Quando necessária a preparação de novo conjunto de tubos, o agar foi fundido novamente em banho de água sob fervura.

III.6.b.2. Revestimento dos tubos

O agar preparado de acordo com o item anterior, foi utilizado para revestimento dos tubos, isto se conseguiu pelo enchimento e esvaziamento rápido dos mesmos com agar, utilizando-se pipeta "Pasteur". Imediatamente após, foram colocados em banho de gelo.

O conjunto de tubos assim preparado, foi colocado em dessecador durante aproximadamente 24 horas e logo estocado em condições ambientais.

III.6.b.3. Preparo do agar-soro-antitoxi na

O soro diluído à metade da concentração final desejada, 1:10, com tampão PBS, foi colocado em banho de água a temperatura controlada, até atingir 50°C. Um igual volume de agar fundido e esfriado a temperatura de 50°C, foi adicionado à preparação anterior, obtendo-se assim a diluição final de 1:20.

Com esta solução de agar-soro, os tubos foram preenchidos até a metade com o auxílio de pipeta "Pasteur", evitando-se escorrer a solução pelas paredes internas dos tubos e a formação de bolhas de ar.

III.6.b.4. Preparo das soluções de antígenos

As enterotoxinas puras, antígenos, foram diluídas utilizando-se tampão PBS nas seguintes concentrações: 64, 32, 16, 8, 4 e 2 $\mu\text{g/ml}$.

Um volume de aproximadamente 0,5 ml das soluções de antígenos foi adicionado a cada tubo contendo agar antissoro.

Os tubos selados com papel para-filme, foram incubados a 25°C durante 7 dias.

III.6.b.5. Leitura das bandas de precipitação e construção da curva padrão (Figuras 2 e 3)

Após a incubação, o comprimento da banda de precipitação desenvolvida, foi medido com o auxílio de um paquímetro, levou-se este valor a um gráfico contra o logaritmo das respectivas concentrações de antígenos, o que nos permitiu obter a curva padrão, na qual a cada valor de comprimento correspondeu uma concentração de antígeno (Figura 17).

Foram construídas duas curvas padrão, uma para o sistema antígeno-anticorpo A, e outra para o sistema B.

III.6.b.6. Análise das amostras

Um volume de 0,5 ml de cada amostra de acordo com o processo descrito no item III.4.c., foi adicionado ao res-

pectivo tubo de agar-soro anti-A ou anti-B e incubado a 25°C durante 7 dias.

Após a incubação, os comprimentos das bandas de precipitação foram medidos como no item III.6.b.5, e pela curva padrão obtiveram-se as concentrações das enterotoxinas presentes nas amostras.

No caso da enterotoxina A, o valor da concentração obtido da curva padrão, foi dividido pelo valor 5, uma vez que a amostra foi concentrada 5 vezes.

X A cada ponto, correspondeu à média aritmética de três repetições, uma vez que a cada parâmetro estudado, correspondiam três frascos de culturas como descrito anteriormente no item III.5.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Caracterização da cultura de Staphylococcus aureus S-6.

Os testes bioquímicos realizados, confirmaram as características da linhagem em estudo.

IV.2. Estudo da cinética de crescimento.

A temperatura ótima de crescimento obtida para a linhagem S-6 foi $39,4^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, com uma velocidade específica, k , de $15,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. A temperatura inferior considerada neste experimento foi de $22,6^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ com valores de k , $2,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e $5,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1, Figura 4). A temperatura de $44,8^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ foi a mais alta na qual ainda se encontrou crescimento. Os valores cardinais de temperatura foram próximos aos observados para outras linhagens de S. aureus (44, 71).

IV.3. Produção das enterotoxinas A e B em meio NAK a pH 7,0 e 37°C pelo método de saco de celofane.

A enterotoxina B somente pode ser detectada após 12 horas de incubação e a enterotoxina A após 15 horas (Tabela 2, Figura 5). O método de análise, difusão simples em gel, não nos permitiu determinar com precisão o início da secreção das toxinas, uma vez que a mínima concentração capaz de ser determi

X nada por este procedimento é a de $1\mu\text{g/ml}$. Métodos mais sensíveis de determinação, bem como concentração das amostras destinadas à análise de enterotoxina B, não foram utilizados, uma vez que o principal objetivo do trabalho foi a comparação na produção das enterotoxinas A e B em diferentes condições de cultura, e não o estudo detalhado da cinética desta produção. Estudos relativos à produção de ambas as enterotoxinas no início e durante a fase exponencial de crescimento, utilizando a linhagem S-6 foram anteriormente efetuados por outros pesquisadores (19).

Para o estudo da variação das velocidades de síntese das enterotoxinas, determinou-se a quantidade de toxina - produzida por hora, num dado intervalo de tempo. Para a enterotoxina B observou-se um máximo de produção de $9,5\mu\text{g/ml/h}$ no intervalo entre 18 e 24 horas (Tabela 3, Figura 6) e para a enterotoxina A $0,12\mu\text{g/ml/h}$ no intervalo de 12 a 15h (Tabela 3, Figura 7). Os intervalos apreciados, assim como a quantidade de toxina produzida por hora, devem ser considerados como aproximados, já que para a obtenção de dados mais precisos, as determinações deveriam ter sido realizadas a intervalos de tempo mais curtos.

IV.4. Estudos dos parâmetros que afetam a produção das enterotoxinas estafilocócicas.

A determinação das porcentagens de inibição da produção de enterotoxinas observadas nos itens IV.4.1 a IV.4.4.

refere-se a um período de incubação de 72 horas.

IV.4.1. Estudo do efeito da temperatura de incubação na produção de enterotoxinas.

A máxima produção de ambas as toxinas, correspondeu à temperatura de ótimo crescimento da linhagem, ou seja, $39,4^{\circ}\text{C}$. A esse respeito, grande parte da literatura indica 37°C como sendo a temperatura ótima de crescimento e produção de enterotoxinas, no entanto trabalhos mais recentes coincidem com os resultados por nós obtidos (66) (Tabela 4, Figuras 8 e 9).

O efeito da temperatura na produção das enterotoxinas A e B, foi diferente para cada uma delas. A 45°C houve um decréscimo de 82% para B e de 25% para A em relação ao valor obtido à temperatura ótima (Tabela 10). A 25°C , a produção de toxina B sofreu uma redução de 90% e a de toxina A de 26% (Tabela 10).

IV.4.2. Estudo do efeito de pH na produção de enterotoxinas.

O pH ótimo para a produção de ambas as enterotoxinas 7,0, coincidiu com o valor ótimo para o crescimento. O intervalo de máxima produção situou-se entre os valores de pH 6,5 e 7,5 para as toxinas A e B (Tabela 5, Figura 10 e 11). Para valores extremos de pH 5,0 e 9,0, houve um decréscimo de 98% para a toxina B e de 50% para a A, sendo totalmente inibida a produção de ambas as enterotoxinas a pH 4,5 (Tabela 11).

IV.4.3. Estudo do efeito da concentração salina na produção das enterotoxinas.

Observou-se uma relação direta entre o aumento da concentração salina (NaCl) e o decréscimo na produção das enterotoxinas (Tabela 6 e 7), sendo este efeito mais marcante na produção de enterotoxina B (Figura 12 e 13). Para 1% de NaCl, a produção de toxina B sofreu um decréscimo de 40% e a toxina A de apenas 7% (Tabela 12). As demais concentrações do sal afetaram a produção de ambas as toxinas de forma menos acentuada e aproximadamente linear.

As enterotoxinas A e B, não foram detectadas a concentrações do sal acima de 10%. Estas observações coincidiram com os resultados obtidos por outros autores (26,27,31).

IV.4.4. Estudo do efeito combinado de concentrações salinas e pH na produção de enterotoxinas, (Tabela 8 e 9, Figuras 14 e 15).

Para o valor de pH 7,0 e concentrações de NaCl de 1, 2 e 4%, as porcentagens de inibição para enterotoxina B foram muito maiores quando comparadas às de A (Tabela 13). Com a combinação de concentrações de 2% de NaCl e valores de pH de 7,0; 6,5 e 6,0, houve uma inibição de 55, 64 e 67% para enterotoxina B e para enterotoxina A, nestas mesmas condições, observamos as porcentagens de 18, 43 e 51% de inibições respectivamente.

A análise dos resultados obtidos aos mesmos valo -

res de pH e 4% de NaCl, nos mostraram que as ^{porcentagens} vantagens de inibição cresceram de modo drástico, correspondendo para a enterotoxina B os valores de 83, 88 e 90% e para enterotoxina A de 31, 65 e 100%, respectivamente. Pode-se também observar que à medida que a concentração salina aumentou, o efeito inibidor dos valores de pH decrescentes passou a ser quase desprezível.

IV.5. Considerações gerais.

Pelos resultados obtidos observa-se que a produção de enterotoxina B foi mais afetada que a de A pelos valores extremos de pH e temperatura, e como por concentrações salinas crescentes. Estes resultados comprovam as observações de outros pesquisadores que trabalharam com linhagens distintas (26,36,45). No entanto, a forma de ação destes agentes na excreção das enterotoxinas ou na sua síntese, até o presente momento não se encontra satisfatoriamente explicada, deixando assim possibilidades para estudos posteriores.

A relação das concentrações das enterotoxinas B e A (B/A), nos experimentos realizados ficou compreendida entre 30 e 300. Estes resultados também concordam com os encontrados na literatura (19,62).

Os resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura, pH e NaCl na produção de enterotoxinas A e B, concordaram em geral com os obtidos por outros pesquisadores que utilizaram diferentes linhagens para o estudo das enterotoxinas.

Desta maneira, ficou esclarecido que o comportamento observado para cada toxina, no que diz respeito a velocidade de secreção, concentração nos diferentes estágios de cultura e efeito dos demais parâmetros em estudo, parecem ser propriedades intrínsecas da toxina em questão e não da linhagem produtora.

A extrapolação direta dos resultados obtidos para recomendações no processamento e conservação de alimentos, deve ser considerada juntamente com uma etapa intermediária de estudo das propriedades intrínsecas dos alimentos em questão (55), bem como o desenvolvimento de S. aureus e produção de enterotoxinas nesses alimentos, a fim de se determinar as condições mais adequadas para o seu processamento. Não obstante, numa primeira aproximação podemos indicar que: concentrações salinas da ordem de 12% de NaCl a pH 7,0; concentrações superiores a 4% combinadas a valores de pH iguais ou inferiores a 6,0 e temperaturas inferiores a 20°C ou superiores a 45°C, propiciam uma inibição marcante na produção das enterotoxinas A e B.

V. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos em relação ao crescimento e produção de enterotoxinas da cultura de Staphylococcus aureus S-6, nos leva às seguintes conclusões:

1. Há coincidência nos valores de temperatura e pH ótimo no que diz respeito ao crescimento da cultura e produção de enterotoxinas A e B.
2. Os intervalos de máxima produção de enterotoxinas estiveram situados entre 12 a 15 horas e 18 a 24 horas para as enterotoxinas A e B, respectivamente.
3. A produção de enterotoxina B foi de 30 a 300 vezes superior a de A.
4. A produção de enterotoxina B foi mais afetada pelos valores extremos de temperatura e pH, assim como pelas concentrações salinas crescentes.
5. No efeito combinado de NaCl e pH, a medida que a concentração salina aumentou, o efeito inibidor do pH decrescente passou a ser desprezível na produção de ambas as toxinas.
6. Os efeitos dos diversos parâmetros na produção de ambas as toxinas, provenientes de uma única linhagem, concordaram em geral com os resultados de outros pesquisadores que utilizaram linhagens diversas para a produção destas enterotoxinas.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, New York - Recommended methods for the microbiological examinations of foods. - New York, 1958.
2. ANGELOTTI, R. - Staphylococcal intoxications . In: RIEMANN , H., ed. Food-borne infections and intoxications. New York, Academic Press, 1969. p. 359-393.
3. BAIRD-PARKER, A.C. - Methods for classifying Staphylococci - and Micrococci. In: GIBBS, B.M. & SKINNER, F.A., ed. I- dentification methods for microbiologists. London, Acade- mic Press, 1966. p. 59-64.
4. BARBER, M.A. apud MINOR, T.E. & MARTH, E.H. - Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. Review I. J. Milk Food Technol., 34:557-564, 1971.
5. BARRY, A.L.; LACHICA, R.V.F. & ATCHINSON, F.W. - Identifica- tion of Staphylococcus aureus by simultaneous use of tu- be coagulase and thermonuclease tests. Appl. Microbiol. , 25:496-497, 1973.
6. BENNETT, R.W. - Microbiological methods. J. AOAC, 54:1037 - 1038, 1971.
7. BERGDOLL, M.S. - Chemistry and detection of staphylococcal enterotoxin. Proc. 14th, Res. Conf. Am. Meat Inst. Found., Circ. 70:47, 1962.
8. BERGDOLL, M.S. - The enterotoxins. In: COHEN, J.O., ed. The

- staphylococci. Toronto, Wiley-Interscience, 1972. p. 301-331.
9. BERGDOLL, M.S.; CHU, F.S.; BORJA, C.R.; HUANG, I.Y. & WEISS, K.F. - The staphylococcal enterotoxins. Japan J. Microbiol. 11:358-368, 1967.
10. BERGDOLL, M.S.; REISER, R. & SPITZ, J. - Staphylococcal enterotoxin detection in food. J. Food Technol., 30. nº 5:80-83, 1976.
11. BERGDOLL, M.S. & ROBBINS, R.N. - Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. J. Milk Food Technol., 36:610-612, 1973.
12. BERGDOLL, M.S.; SURGALLA, M.J. & DACK, G.M. - Staphylococcal enterotoxin. J. Immunol., 83:334-338, 1959.
13. BIER, O.G. - A interação antígeno-anticorpo. In: — Imunologia básica e aplicada. São Paulo, Guanabara Koogan, 1973. p. 155-219.
14. BUCHANAN, R.E. & GIBBSON, N.E. - "Bergey's manual of determinative bacteriology". 8th ed. Williams & Wilkins. Baltimore, 1974. p. 478-480.
15. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. - Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Appl. Microbiol., 13:181-189, 1965.
16. CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E. & STONE, J.E. - The microslide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. Health Lab. Sci. 6:185-197, 1969.

17. CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S. & ROBINSON, J. - Designation of staphylococcal enterotoxins. J. Bacteriol., 85:715-716, - 1963.
18. CHAPMAN, G.H. apud MINOR, T.E. & MARTH, E.H. - Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. Review I. J. Milk Food Technol., 34:557-564, 1971.
19. CZOP, J.K. & BERGDOLL, M.S. - Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional and stationary growth phases. J. Infect. Immun., 9:229-235, 1974.
20. DAVIS, B.D.; DULBECO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD W.B. & McCARTY, M. - Staphylococci. 8th ed. In: — Microbiology. New York, Hoeber Medical; 1970. p. 727-740.
21. DIETRICH, G.G.; WATSON, R.J. & SILVERMAN, G.I. - Effect of shaking speed on the secretion of enterotoxin B by Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 24:561-566, 1972.
22. FRIEDMAN, M. E. - Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures. J. Bacteriol., 92:277-278, 1966.
23. FRIEDMAN, M.E. - Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation by cell wall blocking agents and other compounds. J. Bacteriol., 95:1051-1055, 1968.
24. FUNG, D.Y.C. & WAGNER, J. - Capillary tube assay for staphylococcal enterotoxins A, B and C. Appl. Microbiol., 21 : 559-561, 1971.
25. GANDHI, N.R. & RICHARDSON, G.H. - Capillary tube immunological assay for staphylococcal enterotoxins. Appl. Microbiol.

21:626-627, 1971.

26. GENIGEORGIS, C.; FODA, M.S.; MANTIS, A. & SADLER, W.W. - Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. Appl. Microbiol., 21:862-866, 1971.
27. GENIGEORGIS, C. & SADLER, W.W. - Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. J. Bacteriol., 92 : :1383-1387, 1966.
28. HALL, H.E.; ANGELOTTI, R. & LEWIS, K.H. - Detection of the staphylococcal enterotoxin in food. Health Lab. Sci., 2 : :179-191, 1965.
29. HILKER, J.S.; HEILMAN, W.R.; TAN, P.L.; DENNY, C.B. & BOHRER C.W. - Heat inactivation of enterotoxin A from Staphylococcus aureus in veronal buffer. Appl. Microbiol., 16 : :308-310, 1968.
30. HOBBS, B.C. - El vehiculo de la infeccion. In: — Higiene y toxicologia de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1971. - p. 53-79.
31. HOJVAT, S.A. & JACKSON, H. - Effects of sodium chloride and temperature on the growth and production of enterotoxin B by Staphylococcus aureus. Can. Food. Technol., 2:56-59, 1969.
32. HUMPHREY, J.H. & WHITE, R.G. - Serological aspects of the antigen-antibody reaction: the detection and measurement of antigen and antibody. In: — Immunology for students of medicine. 3th ed. Oxford, Blackwell, 1971, p. 348-407.

33. HUTZER, R.U. - Estafilococcias. In: MARCONDES, E., ed. Pediatrica básica. 5ª ed. São Paulo, Sarvier, 1975. v. 3, p. 1207-1211.
34. INGRAM, M. & KITCHELL, A.G. - Salt as a preservative for foods. J. Food Technol., 2:1-15, 1967.
35. JARVIS, A.W. & LAWRENSE, R.C. - Production of high titers - of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. Appl. Microbiol., 19:698-699, 1970.
36. KATO, E.; KHAN, M.; KUJOVICH, L. & BERGDOLL, M.S. - Production of enterotoxin A. Appl. Microbiol., 14:966-972, 1966.
37. LABUSA, T.P.; CASSIL, S. & SINSKEY, A.J. - Stability of intermediate moisture foods. J. Food Sci., 37:160-162, - 1972.
38. MAH, R.A.; FUNG, D.Y.C. & MORSE, S.A. - Nutritional requirements of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 15:866-870, 1967.
39. MARKUS, Z.H. & SILVERMAN, G.J. - Enterotoxin B synthesis by replicating cells of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 97:506-512, 1969.
40. MARKUS, Z.H. & SILVERMAN, G.J. - Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol. 20:492-496, 1970.
41. MCCOY, D.W. & FABER, J.E. - Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. Appl. Microbiol., 14:372-377, 1966.

42. MILLER, R.D. & FUNG, D.Y.C. - Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by Staphylococcus aureus S-6 in a chemically defined medium. Appl. Microbiol., 25:800-806, 1973.
43. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. - Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. A review I. J. Milk Food Technol., 34:557-564, 1971.
44. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. - Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. A review II. J. Milk Food Technol., 35:21-29, 1972.
45. MORSE, S.A. & BALDWIN, J.N. - Regulation of staphylococcal - enterotoxin B: effect of thiamine starvation. Appl. Microbiol., 22:242-249, 1971.
46. MORSE, S.A. & BALDWIN, J.N. - Factors affecting the regulation of staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immunity, 7:839-846, 1973.
47. MORSE, S.A.; MAH, R.A. & DOBROGOSZ, W.J. - Regulation of staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol., 98:4-9, 1969.
48. ORTH, D.S. & ANDERSON, A.W. - Polymyxin-coagulase-deoxyribonuclease-agar a selective isolation medium for Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 20:508-509, 1970.
49. OUCHTERLONY, O - Antigen antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 32:231-240, 1953.
50. OUDIN, J. - Specific precipitation in gels. Methods Med. Res., 5:335-378, 1952.

51. RAJ, H.D. & BERGDOLL, M.S. - Effect of enterotoxin B on human volunteers. J. Bacteriol., 98:833-834, 1969.
52. REISER, R.F. & WEISS, K.F. - Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. Appl. Microbiol. 18:1041-1043, 1969.
53. RIEMANN, H. - Envenenamento estafilocócico. In: — Curso de intoxicação e infecção alimentar. Campinas, FCTPTA (Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos), 1972. p. 168-208.
54. ROBBINS, R.; GOULD, S. & BERGDOLL, M.S. - Detecting the enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains. Appl. Microbiol., 28:946-950, 1974.
55. SATTERLEE, L.D. & KRAFT, A.A. - Effect of meat and isolated meat proteins on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., 17:906-909, 1969.
56. SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.G.; WAGMAN, J.; SPERO, L.; DUNNERY D.A. & BERGDOLL, M.S. - Purification of staphylococcal enterotoxin B. J. Biochem., 4:1011-1016, 1965.
57. SCOTT, W.J. - Water relations of Micrococcus pyogenes var. aureus at 30°C. Australian J. Exptal. Biol. Med. Sci., 6:549-564, 1953.
58. SILVERMAN, S.J. - Serological assay of culture filtrates for staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol., 85:955 - 956, 1963.
59. TATINI, S.R.; CORDS, B.R. & GRAMOLI, J. - Screening for

- staphylococcal enterotoxins in food. J. Food Technol., 30
nº 4:64-74, 1976.
60. TATINI, S.R.; SOO, H.M.; CORDS, B.R. & BENNETT, R.S. - Heat-
-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth
and libely presence of enterotoxins in foods. J. Food Sci.
40:352-356, 1975.
61. THATCHER, F.S. - Recommended methods for microbiological exa-
mination. In: — Microorganisms in foods. Toronto, Toron-
to Press, 1968. p. 114-122.
62. TOMPKIM, R.B.; AMBROSINO, J.M. & STOZEK, S.K. - Effect of pH,
sodium chloride, and sodium nitrite on enterotoxin A pro-
duction. Appl. Microbiol., 26:833-837, 1973.
63. TROLLER, J.A. - Effect of water activity on enterotoxin B
production and growth of Staphylococcus aureus. Appl. Mi-
crobiol., 21:435-439, 1971.
64. TROLLER, J.A. - Effect of water activity on enterotoxin A -
production and growth of Staphylococcus aureus. Appl. Mi-
crobiol., 24:440-443, 1972.
65. TROLLER, J.A. - Effect of water activity and pH on staphylo-
coccal enterotoxin B production. Acta Alimentaria, 2:351-
-360, 1973.
66. VANDENBOSCH, L.L.; FUNG, D.Y.C. & WIDOMSKI, M. - Optimun tem-
perature for enterotoxin production by Staphylococcus au-
reus S-6 and 137 in liquid medium. Appl. Microbiol., 25:
:498-500, 1973.

67. VAUGH, V.C. apud MINOR, T.E. & MARTH, E.H. - Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. Review I. J. Milk Food Technol., 34:557-564, 1971.
68. VICTOR, R.; LACHICA, F.; WEISS, K.F. & DEIBEL, R.H. - Relationship among coagulase, enterotoxin and heat-stable - deoxiribonuclease production by Staphylococcus aureus. - Appl. Microbiol., 18:126-127, 1969.
69. WU, C.H. & BERGDOLL, M.S. - Stimulation of enterotoxin B production I. Stimulation by fractions from a pancreatic digest of casein. J. Infect. Immunity, 3:777-783, 1971.
70. WU, C.H. & BERGDOLL, M.S. - Stimulation of enterotoxin B production. J. Infect. Immunity, 3:784-792, 1971.
71. YOKOYA, F. - Efeito da concentração salina sobre o crescimento de Staphylococcus aureus. In: Congresso Latino Americano de Microbiologia, 69, Caracas, Venezuela, 1974.

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

LA 1 - Determinação da temperatura ótima de crescimento de S. aureus S-6, utilizando-se incubador gradiente de temperatura, em meio NAK-4% a pH 7,0.

Temperatura $^{\circ}\text{C}$	$1/T \times 10^{-3}$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)	$K \times 10^{-3}$ (min^{-1})	Início da fa se log (min)	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	$1/T \times 10^{-3}$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)	$K \times 10^{-3}$ (min^{-1})	Início da fa se log (min)
1,8	3,392	2,17	360	34,8	3,249	11,67	90
2,8	3,380	2,84	315	36,0	3,236	11,67	90
3,6	3,371	2,51	240	37,7	3,218	13,11	90
5,7	3,348	3,94	210	39,4	3,201	15,87	75
7,5	3,328	4,35	150	40,9	3,186	12,96	90
9,3	3,308	6,00	135	42,1	3,173	11,40	90
11,1	3,288	6,33	90	43,4	3,160	10,20	90
13,1	3,267	9,33	90	44,9	3,146	5,66	105
14,2	3,255	10,10	90	52,8	3,069	-	-

TABELA 2 - Crescimento e produção de enterotoxinas estafilocócicas A e B em meio NAK-4%, a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Tempo (h)	UFC/ml [*]	EEA (μ g/ml) ^{**}	EEB (μ g/ml) ^{***}
12	26,6	0,00	14,2
15	30,5	0,38	15,2
18	45,0	0,50	28,7
24	65,0	0,62	85,6
48	66,6	0,67	198,6
72	71,0	0,72	220,0

*UFC/ml - Unidades formadoras de colônia/ml.

**EEA - Enterotoxina estafilocócica tipo A.

***EEB - Enterotoxina estafilocócica tipo B.

TABELA 3 - Taxa de produção de enterotoxinas A e B por hora em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Intervalos de tempo (h)	μg EEA/ml/h	μg EEB/ml/h
12 - 15	0,126	0,33
15 - 18	0,040	4,50
18 - 24	0,020	9,48
24 - 48	0,002	4,71
48 - 72	0,002	0,89

ABELA 4 - Produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes temperaturas de incubação em meio NAK - 4% e a pH 7,0, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Temperaturas	Tempo de incubação (h)							
	18		24		48		72	
	EEA	EEB	EEA	EEB	EEA	EEB	EEA	EEB
(°C)	Concentração de Enterotoxinas (μ g/ml)							
20,0	0,00	0,00	0,22	1,50	0,31	2,40	0,38	2,90
25,0	0,24	2,40	0,47	9,20	0,53	18,40	0,56	20,30
30,0	0,42	23,80	0,52	69,80	0,59	161,00	0,64	178,40
37,0	0,50	28,70	0,62	85,60	0,67	198,60	0,72	220,00
39,5	0,56	30,30	0,64	87,80	0,70	203,40	0,76	227,30
45,0	0,35	18,60	0,45	25,20	0,52	38,70	0,57	41,60
50,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ABELA 6 - Produção de enterotoxina B (EEB) a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK 4% a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Concentração		Tempo de incubação (h)				
de NaCl	12	15	18	24	48	72
(%,p/v)	Concentração de Enterotoxina B (μ g/ml)					
0	14,20	15,20	28,70	85,60	198,60	220,00
1	8,40	14,80	26,60	65,30	114,60	133,50
2	5,45	13,90	24,60	60,30	88,40	98,60
3	3,20	7,10	20,90	48,40	69,50	78,80
4	2,40	1,60	14,20	23,50	32,50	38,20
5	1,50	1,50	2,70	6,60	18,30	23,10
6	1,30	1,40	2,20	2,70	4,00	6,20
8	0,00	0,70	1,90	2,10	2,80	3,10
10	0,00	0,00	0,00	1,50	2,20	2,40
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ABELA 7 - Produção de enterotoxina A (EEA) a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK 4%, a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Concentração de NaCl	Tempo de incubação (h)					72
	12	15	18	24	48	
(%, p/v)	Concentração de Enterotoxina A (μ g/ml)					
0	0,00	0,38	0,50	0,62	0,67	0,72
1	0,00	0,37	0,48	0,55	0,58	0,67
2	0,00	0,36	0,45	0,51	0,54	0,59
3	0,00	0,29	0,39	0,44	0,47	0,52
4	0,00	0,25	0,37	0,39	0,42	0,50
5	0,00	0,00	0,33	0,36	0,41	0,46
6	0,00	0,00	0,29	0,32	0,39	0,43
8	0,00	0,00	0,00	0,28	0,28	0,32
10	0,00	0,00	0,00	0,21	0,24	0,25
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ABELA 8 - Produção de enterotoxina B (EEB) sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK - 4% a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus

S-6.

Valores de pH										
Tempo de Incubação		6,5								
		6,0								
		Concentração de NaCl (% p/v)								
(h)		1	2	4	1	2	4	1	2	4
Concentração de Enterotoxina B (μ g/ml)										
18		15,20	9,50	0,00	17,60	10,50	1,00	26,60	24,60	14,20
24		37,20	21,60	8,50	39,70	26,30	5,90	65,30	60,30	23,50
18		74,20	57,80	19,20	98,50	67,80	25,70	114,60	88,40	32,50
72		81,50	72,40	23,20	121,20	79,20	27,00	133,50	98,60	38,20

ABELA 9 - Produção de enterotoxina A (EEA) sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK - 4% a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus

S-6.

Tempo de Incubação		Valores de pH							
		6,0				6,5			
(h)		Concentração de NaCl (% p/v)				Concentração de Enterotoxina A (µg/ml)			
		1	2	4	1	2	4	1	2
18		0,25	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,48	0,45
24		0,40	0,28	0,00	0,39	0,30	0,00	0,55	0,51
48		0,48	0,33	0,00	0,50	0,37	0,00	0,58	0,54
72		0,52	0,35	0,00	0,56	0,41	0,25	0,67	0,59

BELA 10 - Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes temperaturas em meio NAK - 4% e pH 7,0 após 72 horas de incubação, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

temperatura (°C)	EEB (µg/ml)	% Redução	EEA (µg/ml)	% Redução
20,0	2,90	99	0,38	50
25,0	20,00	91	0,56	26
30,0	178,00	22	0,64	16
37,0	220,00	4	0,72	5
39,5	227,30	0	0,76	0
45,0	41,60	82	0,57	25
50,0	0,00	100	0,00	100

ABELA 11 - Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes valores de pH, em meio NAK - 4% a 37°C, após 72 horas de incubação, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Valores de pH	EEB (μ g/ml)	% Redução	EEA (μ g/ml)	% Redução
4,5	0,00	100	0,00	100
5,0	5,60	97,5	0,36	50
6,0	83,60	62	0,52	28
6,5	194,80	11	0,65	10
7,0	220,00	0	0,72	0
7,5	188,50	14	0,70	3
8,0	82,00	63	0,59	18
9,0	2,80	99	0,41	43

ABELA 12 - Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK - 4%, a pH 7,0 e 37°C, após 72 horas de incubação, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Concentração de NaCl (% p/v)	EEB (μ g/ml)	% Redução	EEA (μ g/ml)	% Redução
0	220,00	0	0,72	0
1	133,50	40	0,67	7
2	98,60	56	0,59	18
3	78,80	64	0,52	28
4	38,20	83	0,50	31
5	23,10	90	0,44	39
6	6,20	97	0,43	40
8	3,10	98,5	0,32	56
10	2,50	99	0,25	65
12	0,00	100	0	100

ABELA 13 - Porcentagem de redução na produção de enterotoxinas A e B (EEA e EEB), sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK - 4%, a 37°C, após 72 horas, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

Condições de cultura		EEA (μ g/ml)	% Redução	EEB (μ g/ml)	% Redução
pH	NaCl (% p/v)				
7,0	0	0,72	0	220,00	0
	1	0,67	7	133,50	39
	2	0,59	18	98,60	55
	4	0,50	31	38,20	83
6,5	0	0,65	10	194,80	12
	1	0,56	22	121,20	45
	2	0,41	43	79,20	64
	4	0,25	65	27,00	88
6,0	0	0,52	33	83,60	62
	1	0,52	28	81,50	63
	2	0,35	51	72,40	67
	4	0,00	100	23,20	89,5

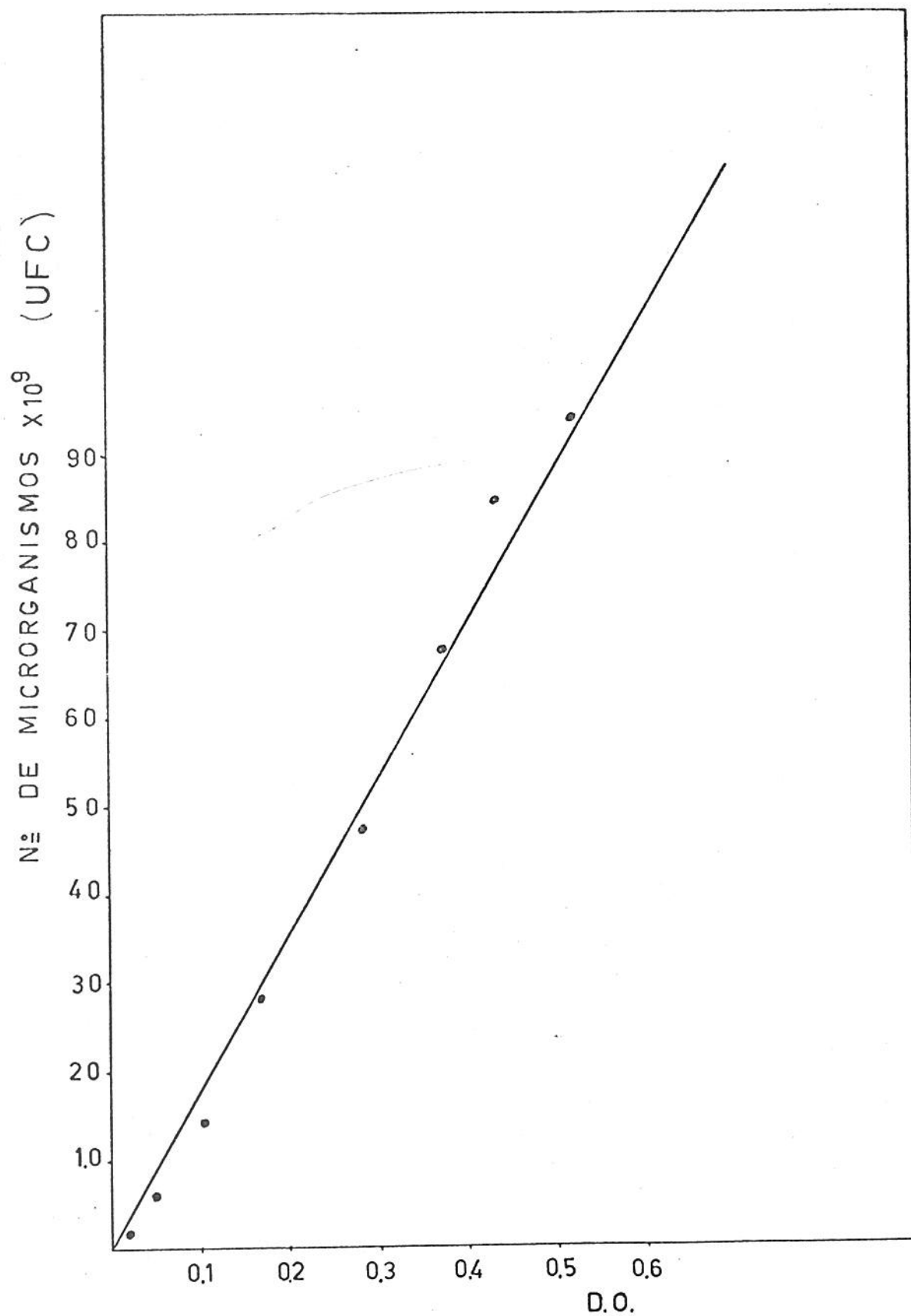


FIGURA 1 - Curva padrão para crescimento da linhagem S. aureus S-6, utilizando-se meio NAK-4%, pH 7,0 e a 37°C.

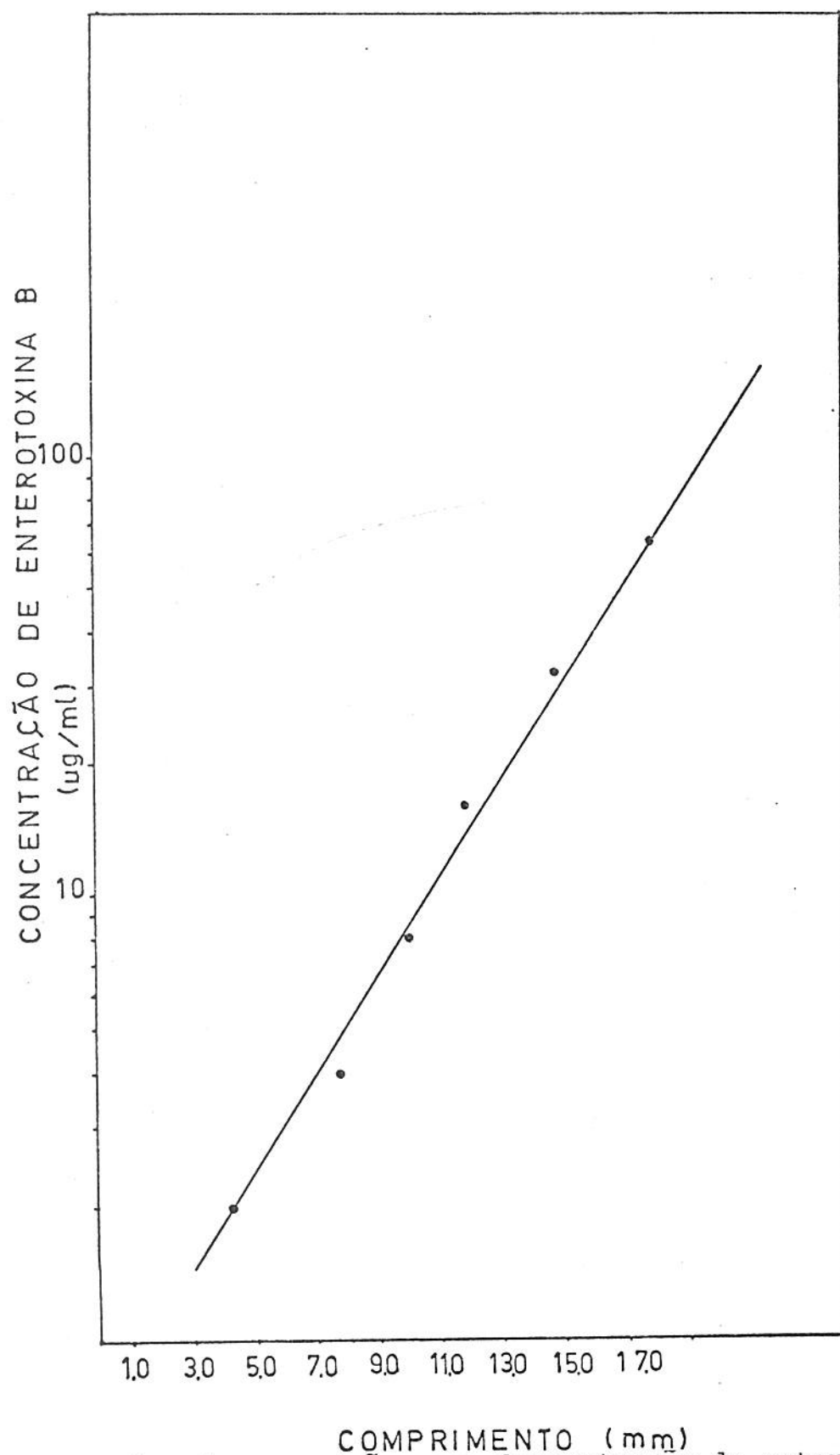


FIGURA 2 - Curva padrão para determinação de enterotoxina estafilocócica tipo B, utilizando-se antissoro na diluição de 1:20.

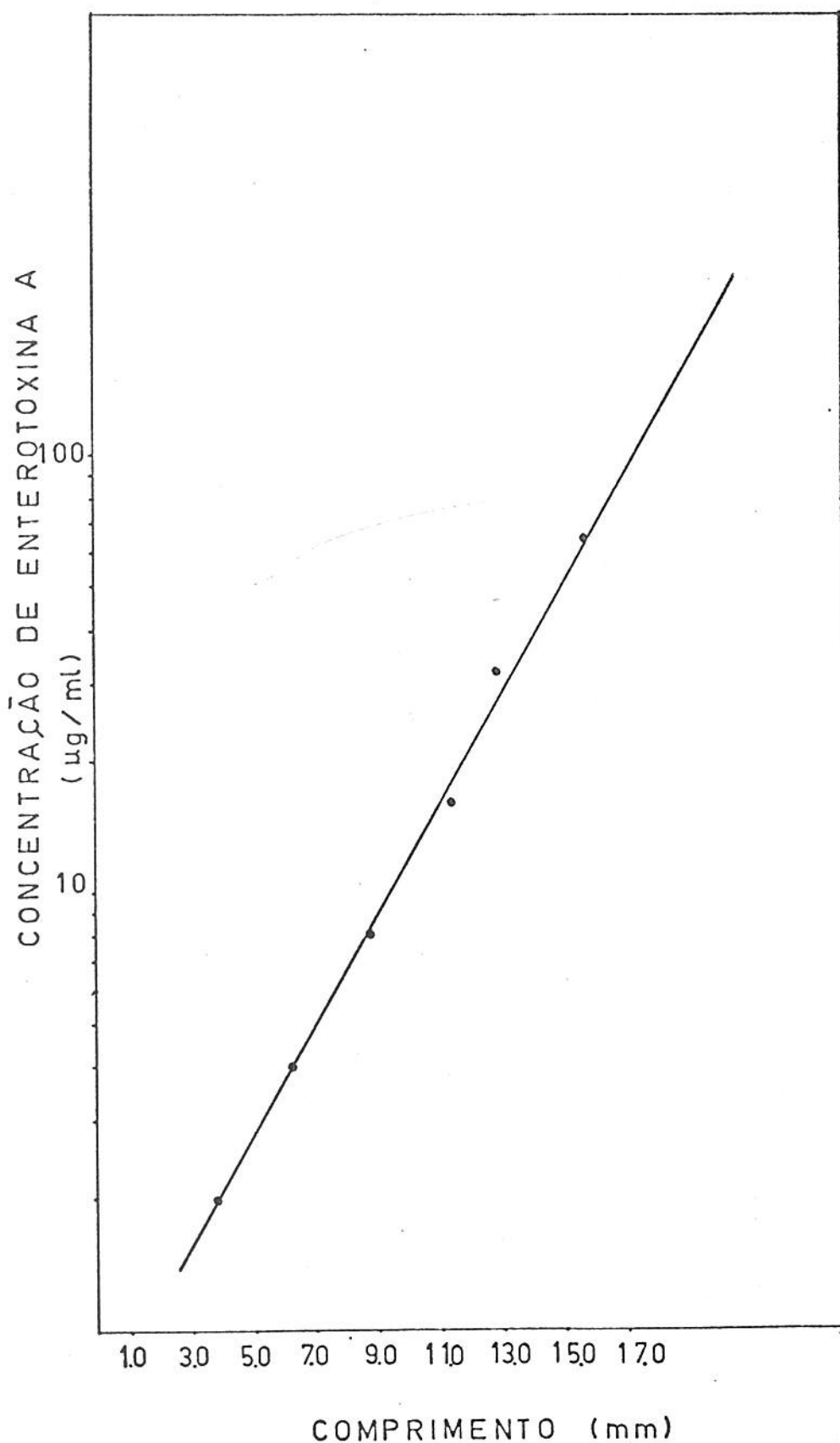


FIGURA 3 - Curva padrão para determinação de enterotoxina estafilocócica tipo A, utilizando-se antissoro na diluição de 1:20.

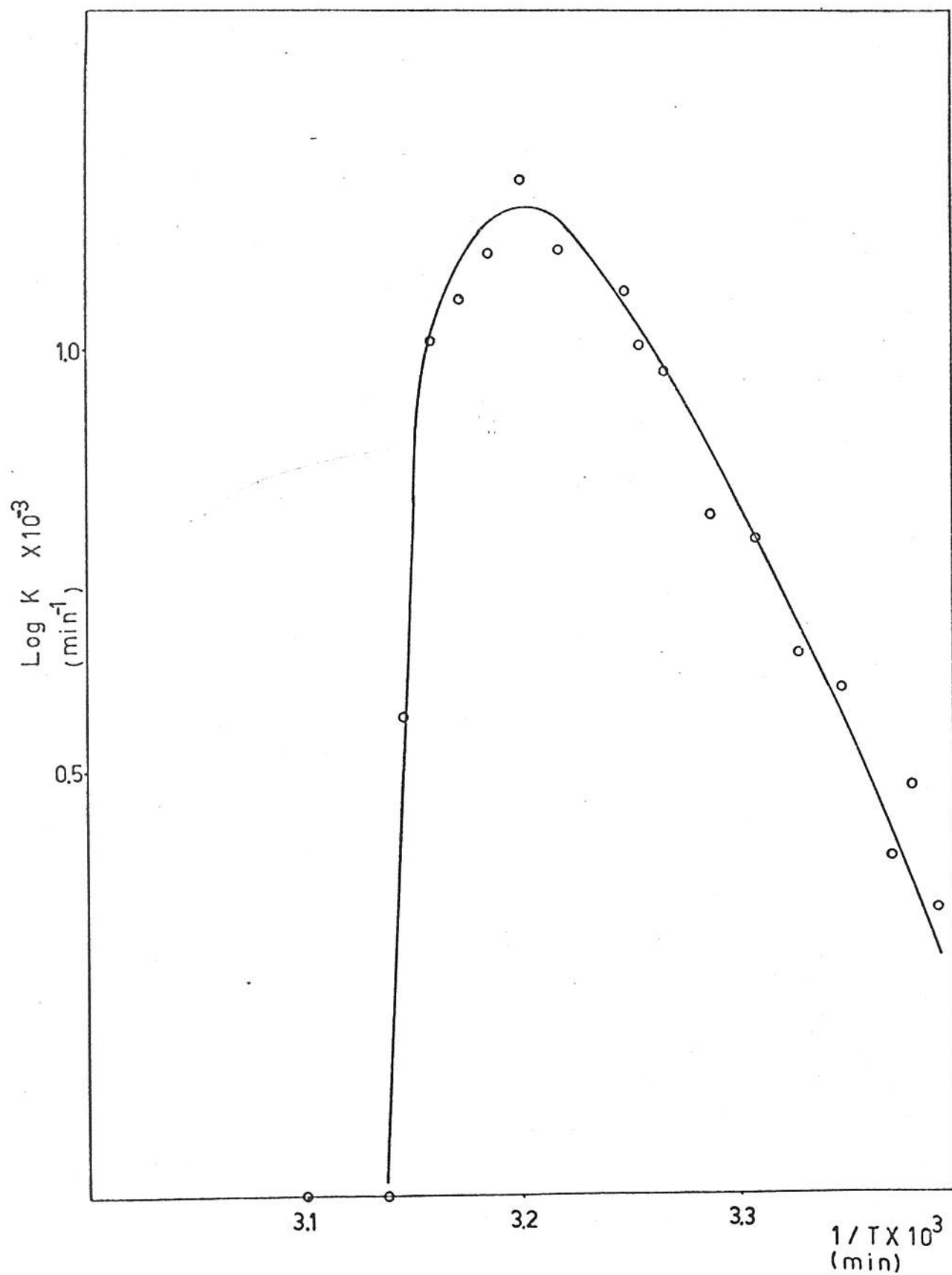


FIGURA 4 - Curva de Arrhenius.

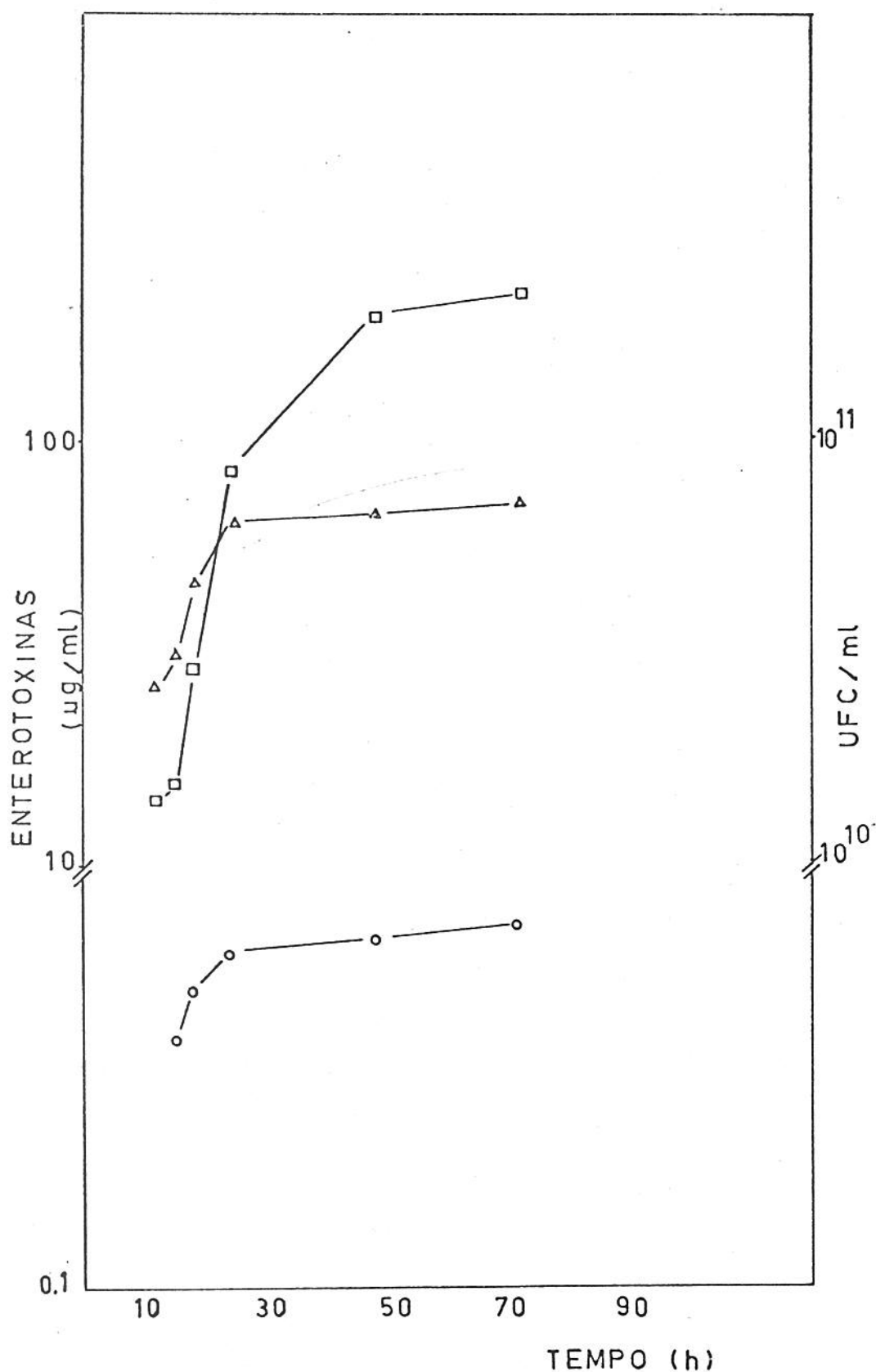


FIGURA 5 - Crescimento e produção de enterotoxinas estafilocócicas A e B (EEA e EEB), em meio NAK-4%, a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: -
 □ - EEB; ○ - EEA e Δ - UFC.

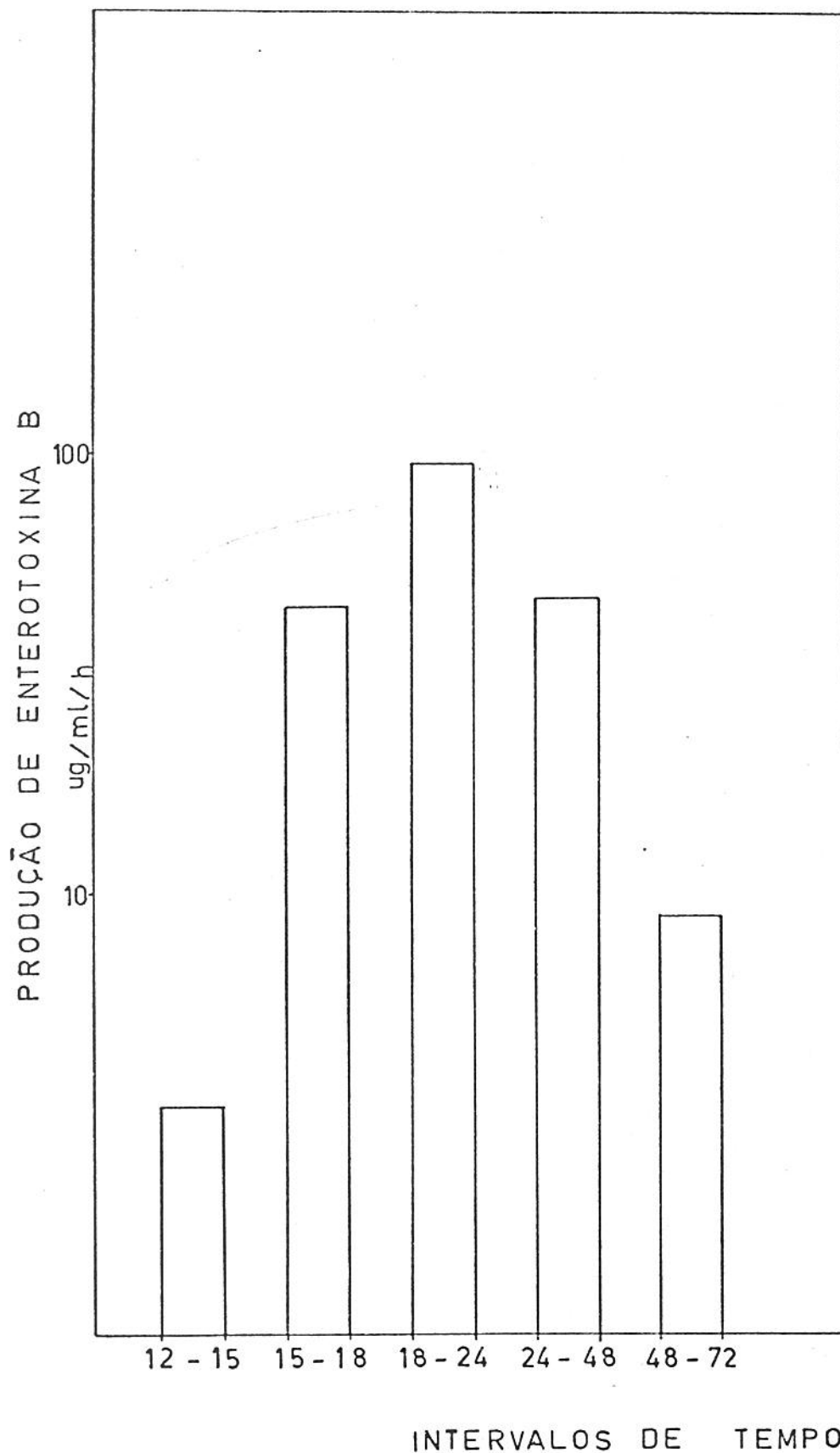


FIGURA 6 - Taxa de produção de enterotoxinas B por hora em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

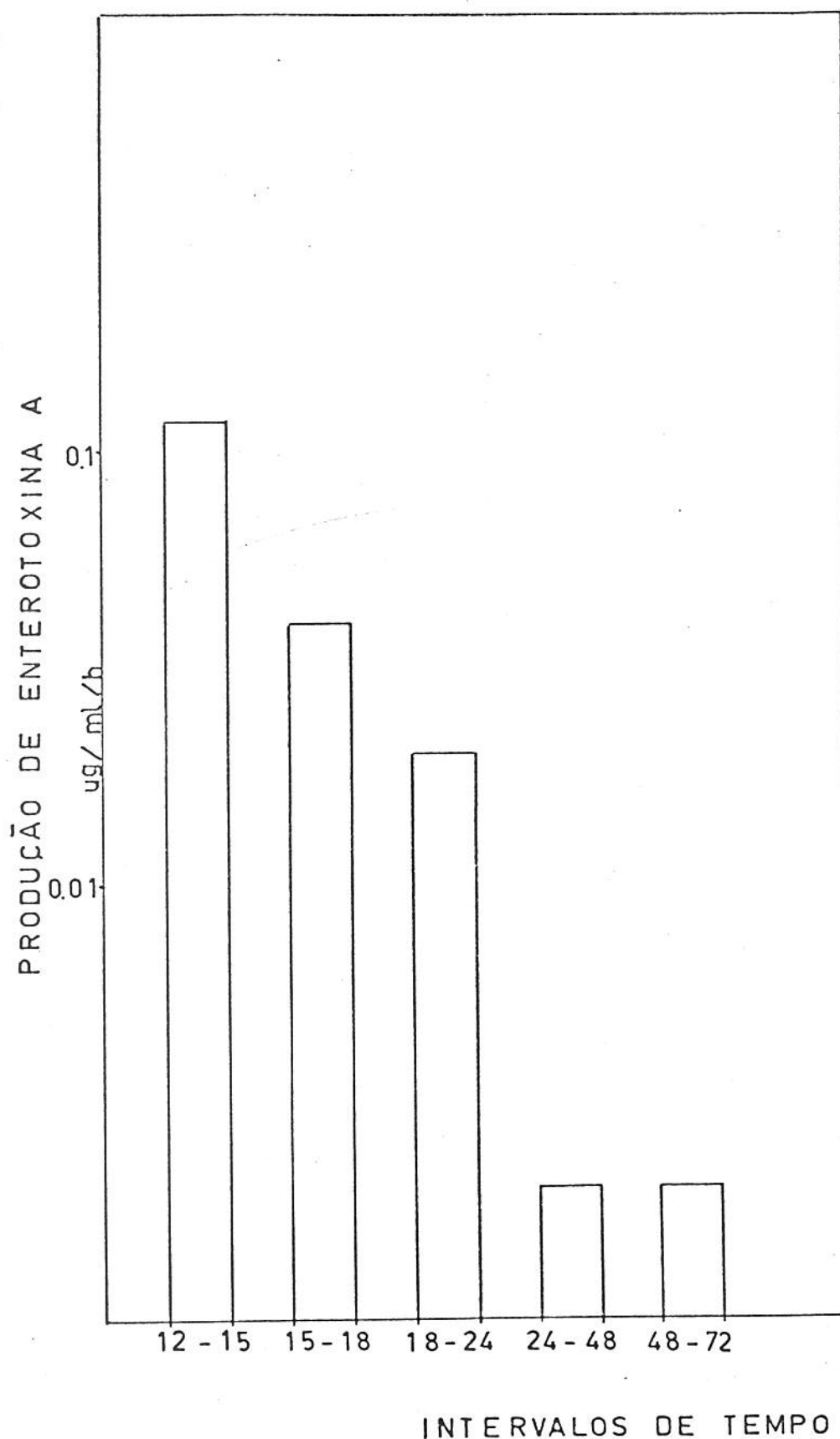


FIGURA 7 - Taxa de produção de enterotoxina A por hora em meio NAK-4% a pH 7,0 e 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6.

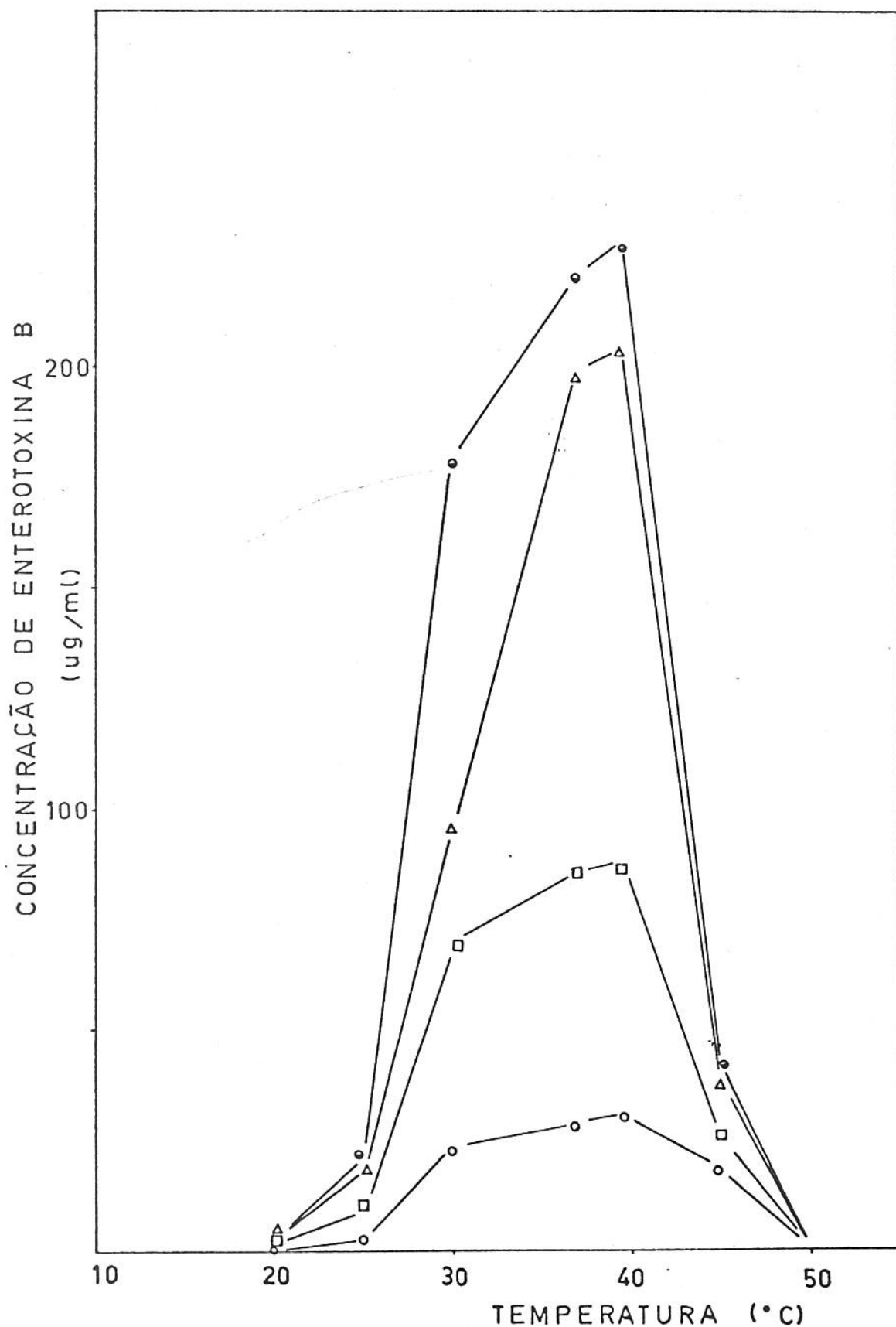


FIGURA 8 - Produção de enterotoxina B, a diferentes temperaturas de incubação em meio NAK-4% e a pH 7,0, utilizando-se a linhagem *S. aureus* S-6. Símbolos: o - 18 h; □ - 24 h; Δ - 48 h e ● - 72 h.

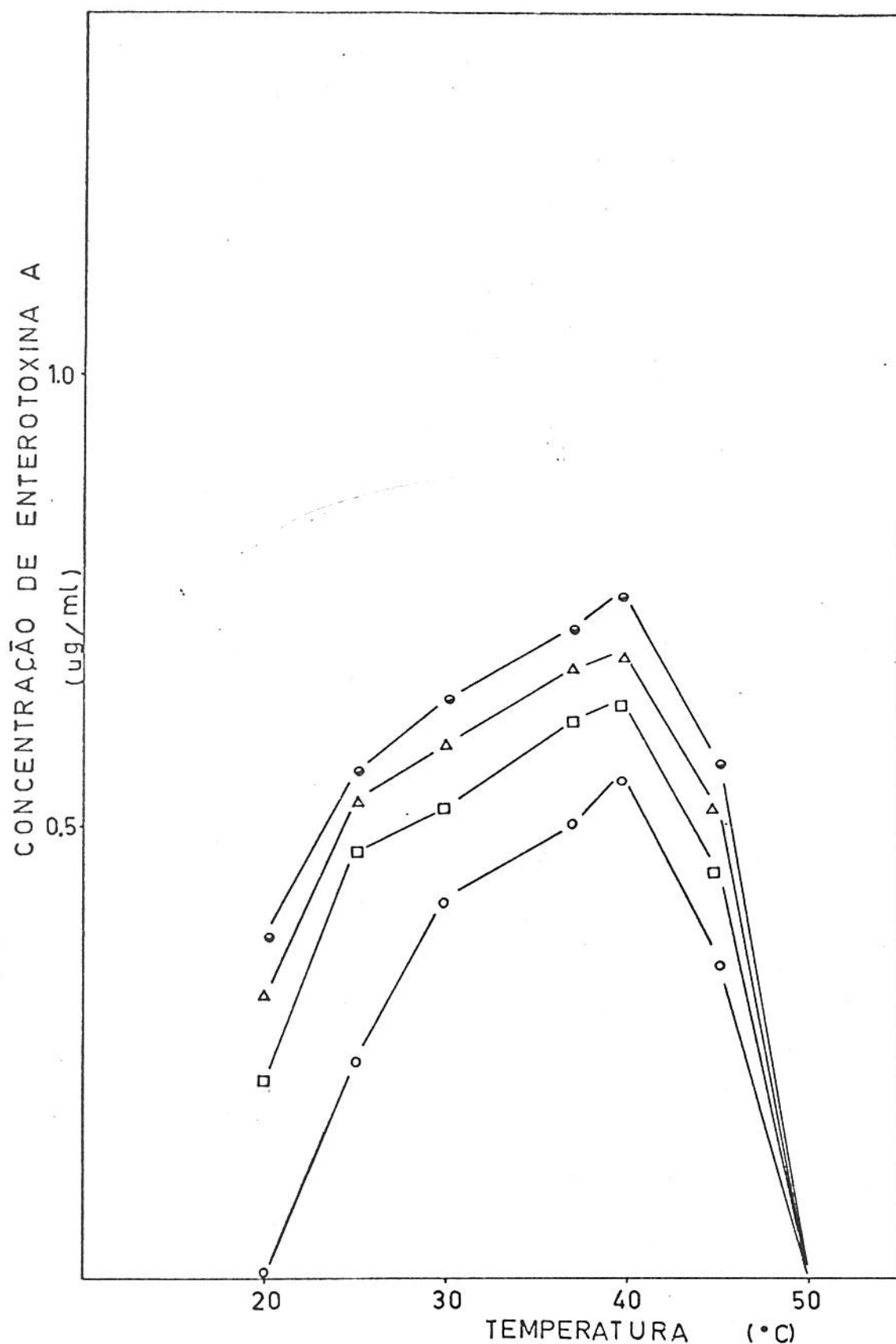


FIGURA 9 - Produção de enterotoxina A, a diferentes temperaturas de incubação em meio NAK-4% e a pH 7,0, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: o - 18 h; □ - 24 h; Δ - 48 h e ● - 72 h.

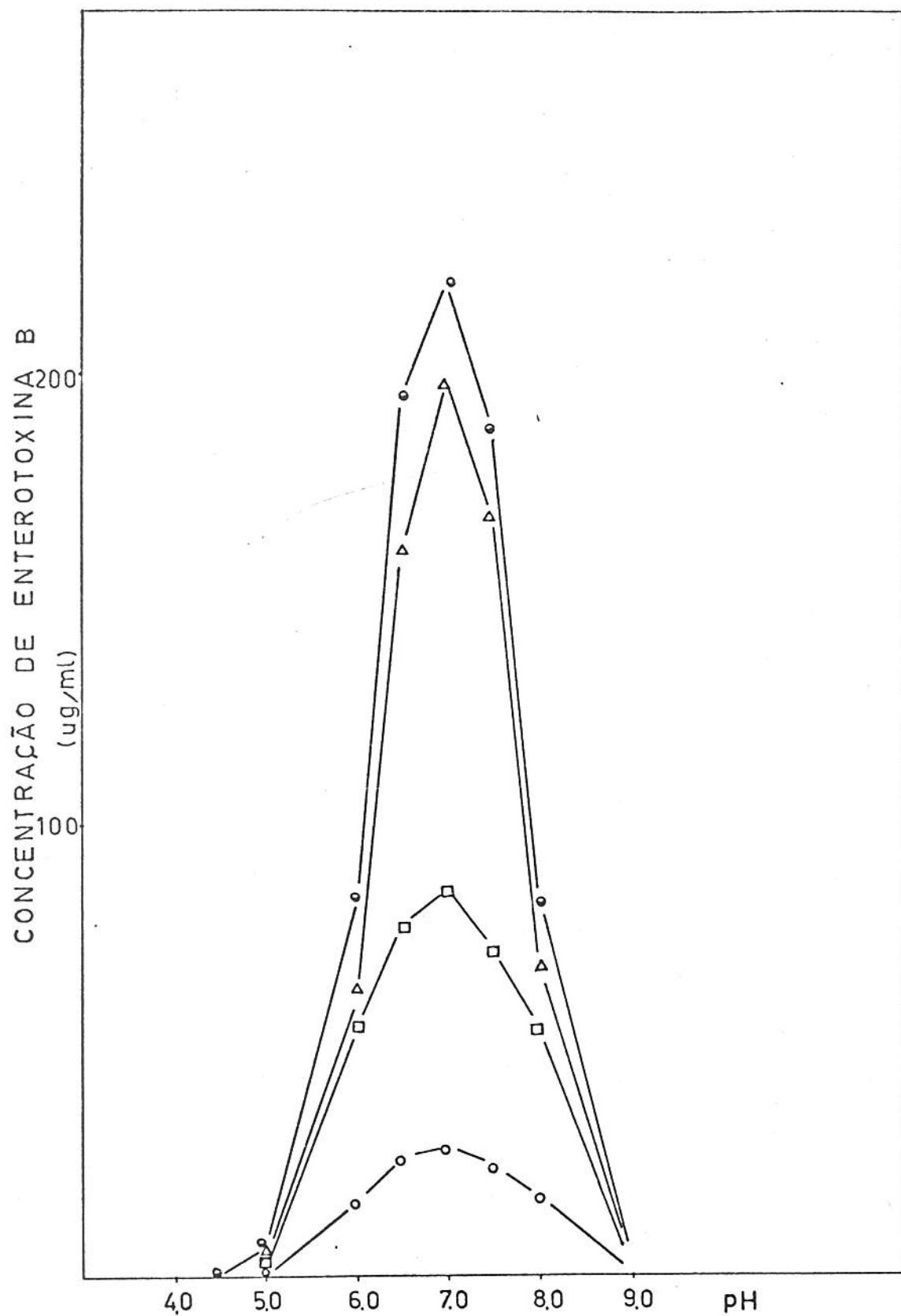


FIGURA 10 - Produção de enterotoxina B, a diferentes valores de pH em meio NAK-4% e a 37°C , utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: o - 18h; □ - 24h; Δ - 48 h; e ● - 72 h.

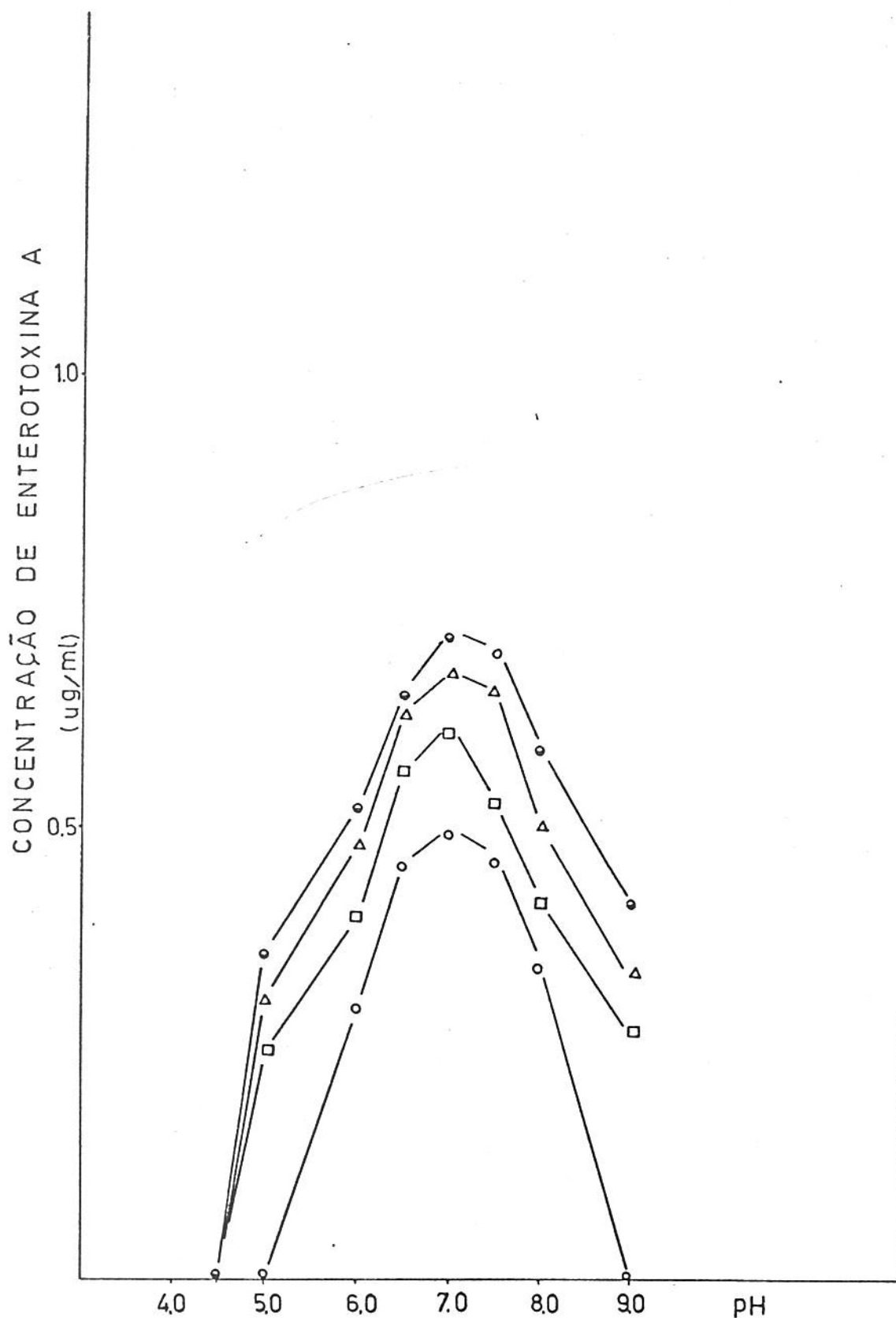


FIGURA 11 - Produção de enterotoxina A, a diferentes valores de pH em meio NAK-4% e a 37°C , utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: o - 18 h; □ - 24 h; Δ - 48 h e ● - 72 h.

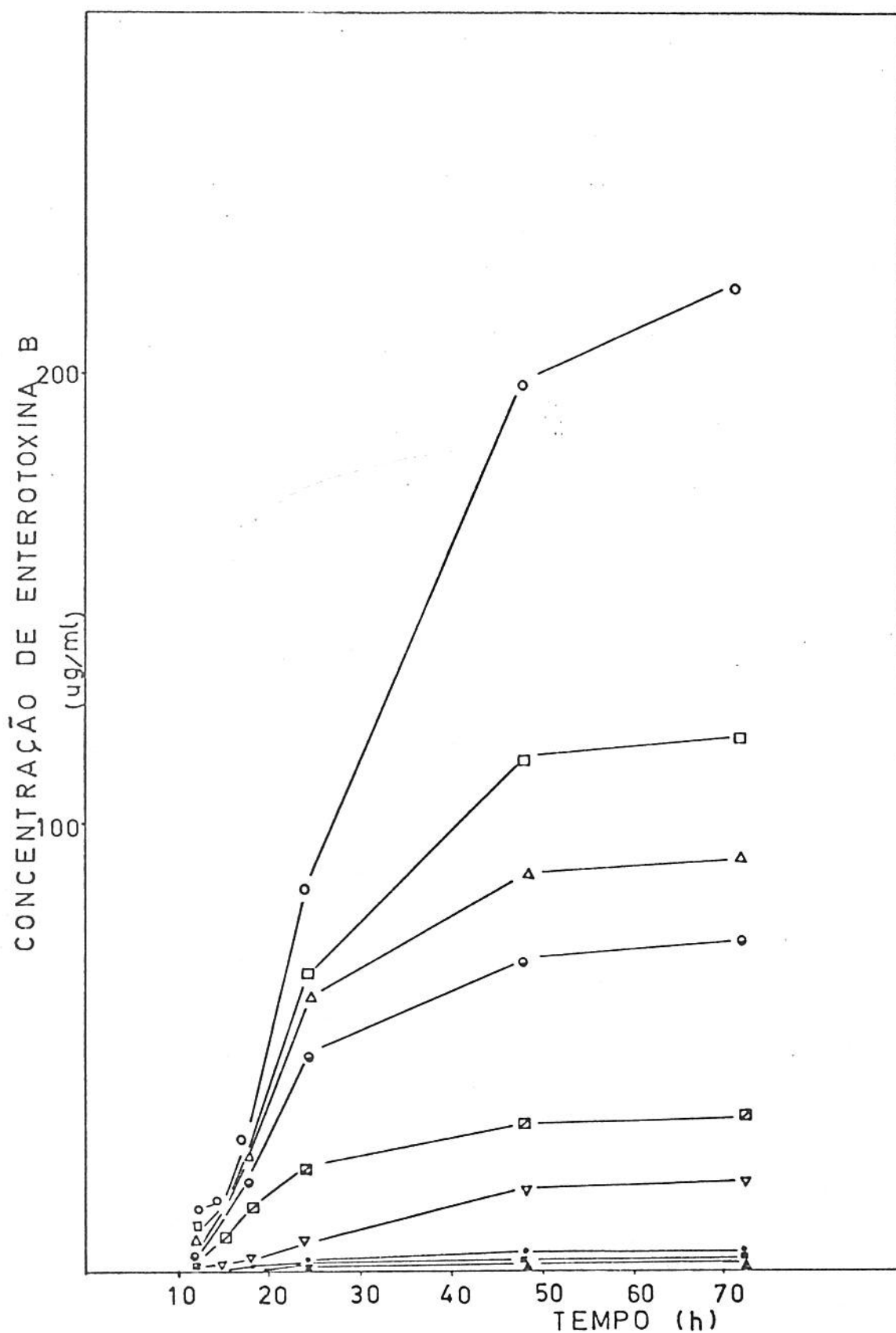


FIGURA 12 - Produção de enterotoxina B, a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4% a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: ▲ - 10% NaCl; ■ - 8% NaCl; ● - 6% NaCl; ▽ - 5% NaCl; □ -

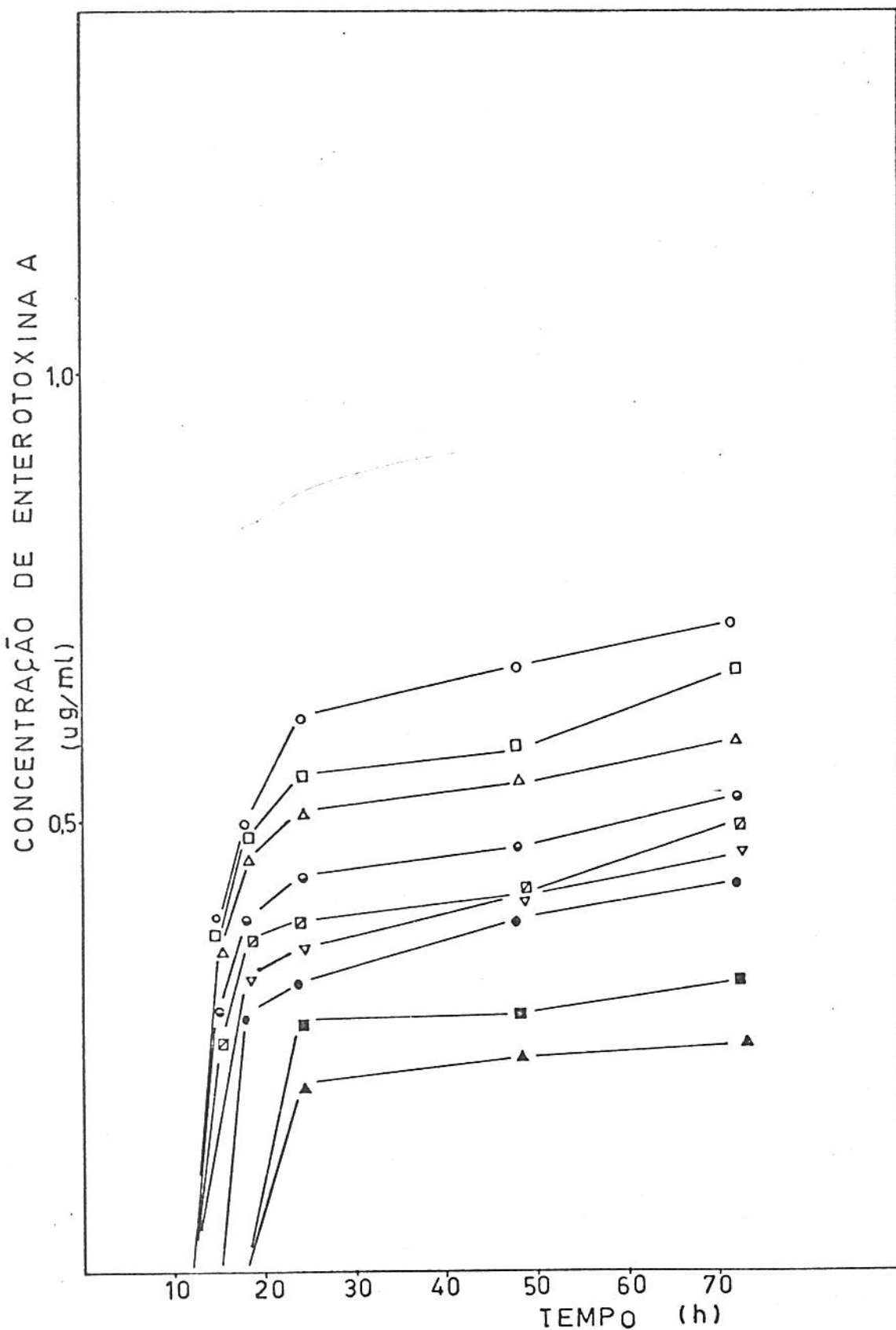


FIGURA 13 - Produção de enterotoxina A, a diferentes concentrações de NaCl, em meio NAK-4% a pH 7,0 e a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: ▲ - 10% NaCl; ■ - 8% NaCl; ● - 6% NaCl; ▽ - 5% NaCl; ◻ -

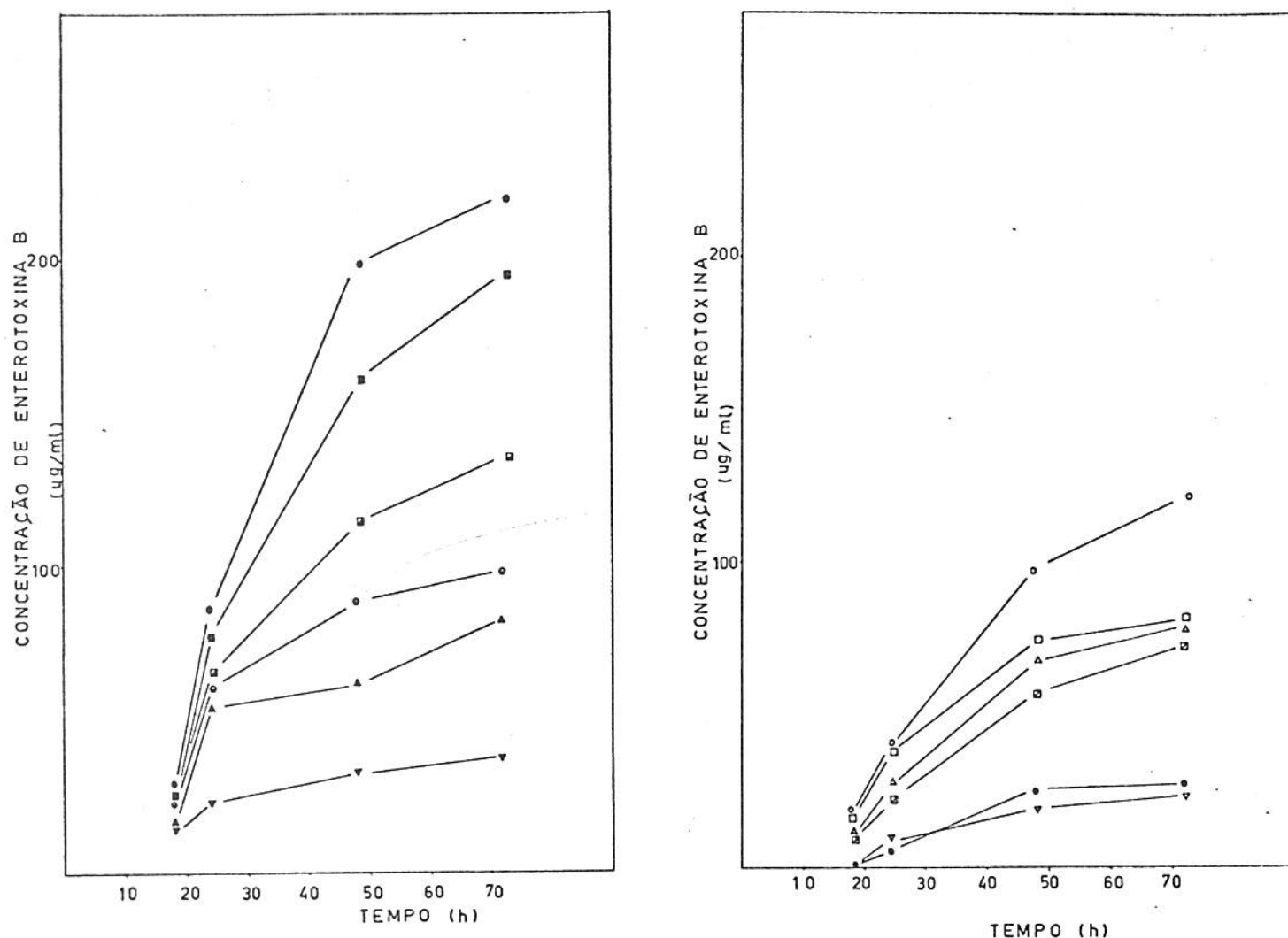


FIGURA 14 - Produção de enterotoxina B, sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4% a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: ▽ - pH 6,0 e 4% NaCl; ◊ - pH 6,5 e 4% NaCl; ◻ - pH 6,0 e 2% NaCl; Δ - pH 6,5 e 2% NaCl; ◻ - pH 6,0 e 1% NaCl; ○ - pH 6,5 e 1% NaCl; ▼ - pH 7,0 e 4% NaCl; ▲ - pH 6,0 e 0% NaCl; ● - pH 7,0 e 2% NaCl; ◻ - pH 7,0 e 1% NaCl; ■ - pH 6,5 e 0% NaCl e ● - pH 7,0 e 0% NaCl.

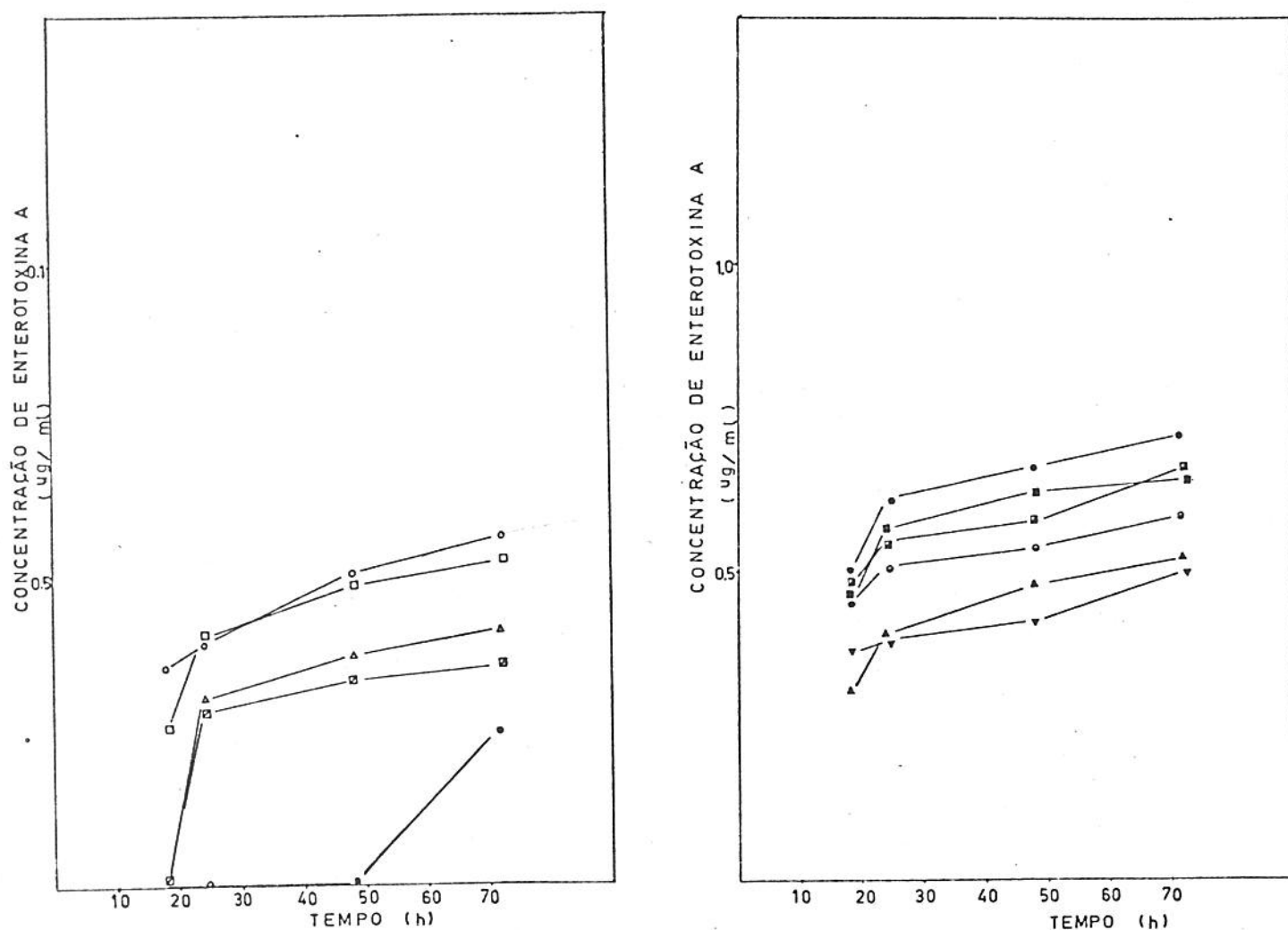


FIGURA 15 - Produção de enterotoxina A, sob a ação conjunta de variações na concentração de NaCl e valores de pH, em meio NAK-4% a 37°C, utilizando-se a linhagem S. aureus S-6. Símbolos: $\bigcirc$ - pH 6,5 e 4% NaCl; $\square$ - pH 6,0 e 2% NaCl; Δ - pH 6,5 e 2% NaCl; $\square$ - pH 6,0 e 1% NaCl; $\bigcirc$ - pH 6,5 e 1% NaCl; ∇ - pH 7,0 e 4% NaCl; $\blacktriangle$ - pH 6,0 e 0% NaCl; $\bullet$ - pH 7,0 e 2% NaCl; $\blacksquare$ - pH 7,0 e 1% NaCl; $\blacksquare$ - pH 6,5 e 0% NaCl e $\bullet$ - pH 7,0 e 0% NaCl.