

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

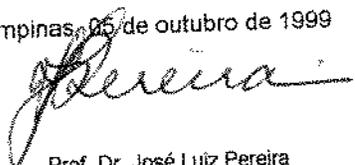
**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
PARA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA
ESTAFILOCÓCICA DO TIPO B**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Vera Maria de Hollanda Mollo, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de outubro de 1999.

**Tese apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos,
para obtenção do título de
Mestre em Ciências Alimentos**

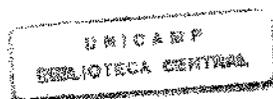
Campinas, 05 de outubro de 1999



Prof. Dr. José Luiz Pereira
Presidente da Banca

**VERA MARIA DE HOLLANDA MOLLO
Biomédica**

**Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA
Orientador**

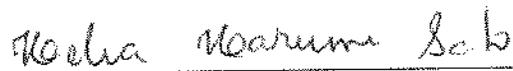


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Orientador)

Prof. Dra. Lucia R. Durrant
(Membro)



Prof. Dra. Helia Harumi Sato
(Membro)



Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad
(Membro)

Campinas, de

de 1999

***Aos meus Pais que sofreram comigo e
sempre me apoiaram nos principais
momentos da minha vida.***

***A Deus o agradecimento pela minha
Vida, e as minhas amigas Norma e
Sílvia a possibilidade de viver e ver
a vida com sentido e felicidade***

***Meu sincero agradecimento ao Professor Doutor
José Luiz Pereira pela paciência, amizade, e
orientação e acima de tudo pela enorme
compreensão nos momentos difíceis
que passei nesse período.***

Agradecimentos

Ao Professor Merlin S. Bergdoll pela efetiva colaboração, suprimindo as necessidades de reagentes e linhagens.

Ao Ro meu especial e grande companheiro que me estimulou e esteve comigo em momentos difíceis desse caminho.

A todos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Rosinha, Dona Olivia e especialmente Dona Teresinha. Dona Terezinha minha amiga que nos minutos difíceis sempre esteve presente iluminando o meu caminho e pedindo a Deus comigo.

Aos estimados funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, Biblioteca da FEA e aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação

À minha amiga e companheira Regina, agradeço pelos incontáveis esforços realizados.

Ao meu querido amigo Álvaro meus sinceros agradecimentos, por batalhar comigo nos momentos deste trabalho.

A todos que contribuíram com amizade, compreensão, carinho amizade na realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biologia que me auxiliaram em muitas etapas deste trabalho.

Aos meus grandes amores: Bia , Marquinho e Fefê.

Resumo

Métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas, sensíveis, rápidos e específicos obtidos diretamente de extrato de alimentos são importantes para a diminuição no tempo de diagnóstico de intoxicações alimentares e no controle sanitário de alimentos.

O trabalho visou a produção, purificação de enterotoxina estafilocócica do tipo B (EEB) para obtenção de respectiva anti imunoglobulina (IgG anti-EEB) e padronização da metodologia ELISA "Duplo Sanduíche" para detecção de enterotoxina B em alimentos.

A enterotoxina B foi purificada através de três etapas utilizando-se resina de troca iônica AMBERLITE CG-50 e CM-Sepharose e coluna de exclusão molecular Sephadex G-75. A purificação de enterotoxina foi determinada através de eletroforese SDS – PAGE.

A enterotoxina estafilocócica do tipo B purificada foi utilizada para imunização de coelhos e cobaias. Os anti-soros policlonais antitoxina B foram utilizados para padronização de método imunoenzimático (EIE) duplo sanduíche visando a detecção de enterotoxina estafilocócica do tipo B em alimentos.

A fração IgG foi purificada por fracionamento com sulfato de amônia e posteriormente foi feita a cromatografia em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200.

No método imunoenzimático duplo sanduíche utilizou-se como anticorpo de captura a imunoglobulina de coelho imunizado anti-enterotoxina B e como anticorpo detetor o anti-soro obtido de cobaia imunizada.

O ensaio imunoenzimático foi padronizado utilizando-se como antígeno a enterotoxina B purificada. A técnica do ELISA mostrou-se bastante sensível sendo detectado 1ng/ml de enterotoxina estafilocócica B.

Summary

Methods of detection of staphylococci enterotoxin, which are sensitive, fast and specific when obtained directly from the extract of food are important for the decrease in time of diagnose of foodborne intoxications and in the sanitary control of foods.

This work intended to produce and purificate staphylococci type B (EEB) for obtaining the respective anti imunoglobulina (IgG anti-EEB) and standardization of the ELISA "Double Sandwich" methodology for detection of enterotoxin B from food.

The enterotoxin B was purified through three stages. For this purpose, ionic change AMBERLITE CG - 50 resin, CM-Sepharose and molecular exclusion Sephadex G -75 column more used. The enterotoxin purification was determined through eletroforese SDS - PAGE.

The stafilococci purified enterotoxin type B was used for immunization of rabbits and guinea-pig. The policlonals antiserums antitoxin B was used for standarlization of double sandwich imunoenzimatic (EIE) seeking the detection of stafilococci enterotoxin type B in food.

The fraction IgG was purified by precipitation with ammonia sulfate followed by molecular exclusion Sephacryl S-200 collumn chromatography.

The imunoglobulin antienterotoxin B of immunized rabbit was used as capture antibody and the antiserums of immunized guinea-pig was used as detector antibody in the double sandwich ELISA. The ELISA standardized by using the purified enterotoxin B as antigen ELISA technique, revealed to be sensitive, being able to detect 1 ng/ml of staphylococci B enterotoxin.

Índice

Índice	1
I-Histórico.....	3
II-Introdução.....	6
III-Objetivos.....	10
IV-Revisão Bibliográfica.....	11
IV.1. Classificação do Gênero <i>Staphylococcus</i>	11
IV.2. Propriedades fisiológicas e bioquímicas do <i>Staphylococcus aureus</i> ...	12
IV.3. Estafilococos enterotoxigênicos.....	15
IV.4. Enterotoxinas Estafilocócicas.....	16
IV.4.1. Estrutura molecular.....	16
IV.4.2. Produção e síntese das enterotoxinas estafilocócicas.....	18
IV.4.3. Estabilidade das enterotoxinas estafilocócicas.....	21
IV.4.4. Ação Biológica das enterotoxinas.....	23
IV.4.5. Purificação das enterotoxinas.....	26
IV.4.6. Reatividade sorológica.....	28
IV.4.7. Métodos Sorológicos de Detecção de Enterotoxinas.....	31
IV. Material e Método.....	36
V.1.Método.....	36
V.1.2. Produção de enterotoxina estafilocócica do tipo B.....	36
V.1.3. Purificação da enterotoxina estafilocócica do tipo B.....	37
V.1.4. Obtenção do soro anti enterotoxina estafilocócica do tipo B e determinação do título.....	38

V.1.5. Purificação de IgG anti-EEB, obtidos em coelhos e cobaias.....	40
V.2. Padronização do ELISA "Duplo Sanduiche".....	41
V.2.1. Determinação do título de uso do conjugado (IgG de coelho anti-IgG de cobaia), conjugado a peroxidase.....	42
V.2.2. Determinação do título de uso do anti-soro de cobaias e anti-soro de coelhos, anti-enterotoxina do tipo B	46
V.2.3. Determinação da sensibilidade do ensaio "EIE" para detecção de enterotoxina B purificada de estafilococos	50
V.2.4 .Determinação da sensibilidade do ensaio, para a detecção da EEB de estafilococos em alimentos.....	53
VI. Resultados.....	57
VI.1. Produção e Purificação da EEB.....	57
VI.2. Obtenção de soro anti EEB e determinação do título.....	62
VI.3. Determinação do título do conjugado.....	63
VI.4. Determinação do título de uso do anti-soro de cobaias e anti-soro de coelhos, anti-enterotoxina B.....	64
VI.5.Determinação da sensibilidade do E.I.E para detecção de enterotoxina estafilocócica do tipo B.....	67
VI.6.Determinação da sensibilidade de ensaio, para detecção de enterotoxina B em alimentos.....	69
VII. Discussão.....	70
VIII. Conclusão.....	76
IX. Referências Bibliográficas.....	78

I. Histórico

A mais antiga, e talvez a maior preocupação da humanidade, foi a busca do alimento com "qualidade". As primeiras Medidas de Higiene dos Alimentos e Normas de Controle de Qualidade no mundo parecem ter surgido entre os povos do Mediterrâneo. Da civilização egípcia têm-se um esboço da Legislação Sanitária contida nos papiros veterinários de Ebers, escritos de 2500 a 2230 A.C. As civilizações grega e romana também apresentaram normas de inspeção de alimentos. Hipócrates, Aristóteles e outros filósofos, associaram as doenças de animais às dos homens e perceberam que algumas dessas poderiam ser transmitidas por alimentos de origem animal. As tribos hebraicas praticavam o controle popular da qualidade dos alimentos, separando-os em puros e impuros, segundo normas religiosas rígidas. Após esses registros, só são observadas medidas sendo tomadas no século XII, na França, porém, ainda destituídas de embasamento científico. (LEVÍTICO 11,2-23 , DEUTERONOMIO 14, 1-21; Bíblia Antigo Testamento)

Somente após a observação visual dos microrganismos por Leewenhoek em 1675 e, mais tarde, com as pesquisas realizadas por Koch em 1878 e Pasteur em 1880 , desenvolveu-se um sistema científico de isolamento e cultivo de bactérias em meio líquido e, portanto, métodos capazes de detectar microrganismos no homem, nos animais e nos alimentos. (PELCZAR, 1993).

Em 1882, Sir Alexander Ogston isolou e associou o *Staphylococcus* a

processos infecciosos purulentos encontrados em homens e animais. Outros experimentos demonstraram que no pús haviam estafilococos e que, se injetados de um animal para outro, reproduziam os mesmos sintomas. Porém, somente em 1884 ROSENBACH obteve uma cultura pura de estafilococos, isolada de úlcera purulenta de homens (BAIRD-PARKER,1990).

O primeiro estudo que associa *Staphylococcus* à intoxicação alimentar foi observado por Vaughan e Stemberg e relatado por DACK, em 1930 que descreveu sobre a ocorrência de intoxicação em indivíduos que consumiram queijo cheddar, em Michigam nos Estados Unidos América (E.U.A.), em 1884.

Pesquisas realizadas por BARBER & DEIBEL 1914, demonstraram que o consumo de leite de vacas mastíticas causavam intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* e DACK e col., em 1949, administraram a voluntários filtrados de cultura obtida de *Staphylococcus* e observaram quadros de intoxicação alimentar, comprovando então, a presença de toxinas no material.

A enterotoxina pré-formada do tipo B, encontrada em alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus* foi identificada por BERGDOLL e col. em 1959. E, em 1961, experimentos foram iniciados para a identificação das enterotoxinas a partir do sobrenadante de cultura de *S.aureus* através de cromatografia de troca iônica; em 1965 foi identificada a enterotoxina C, seguida pela E em 1971 (BERGDOLL) apud BAIRD-PARKER,1990).

Um método rápido para a detecção das enterotoxinas foi desenvolvido por CASMAN & BENNETT, 1965 através da imunodifusão em gel. e mais tarde um ensaio imunoenzimático (ELISA "duplo sanduíche") foi padronizado por

FEY e col., (1982) possibilitando a identificação das enterotoxinas diretamente de extratos de alimentos, detectando concentrações de até 0,1ng/g de toxina em alimentos com significativa especificidade.

II. Introdução

No Brasil os Padrões Sanitários Microbiológicos de Alimentos estão apoiados somente na presença ou ausência de microrganismos (BRASIL 1978, 1987). Em alimentos suspeitos de más condições higiênicas, pesquisa-se somente a presença de *Staphylococcus aureus*, o mesmo não acontecendo em outros países como os E.U.A.. Especificamente, a (AOAC) Association Official Analytical Chemistry que, desde 1994, recomenda a pesquisa de enterotoxinas por ensaio imunoenzimático (E.I.E) "duplo sanduíche" obtido com soros policlonais de coelhos e cobaias (BENNET & McCLURE, 1994). Esse ensaio detecta a presença da enterotoxina termoresistente, que permanece no alimento mesmo após a destruição do microrganismo (ADESIYUN e col., 1984).

O quadro clínico das intoxicações alimentares devido a enterotoxina estafilócica se caracteriza por, após um período médio de 4 horas da ingestão do alimento, o indivíduo apresentar sintomas como vômitos, diarreia, dores abdominais, cefaléia e mal estar generalizado (ADESIYUN & USMAN, 1983, ADESIYUN e col., 1984). Os receptores para as enterotoxinas estafilocócicas estão localizados no intestino delgado e, a partir daí, o centro do vômito é estimulado via vago e nervos simpáticos (ADESIYUN e col., 1984).

Ensaio biológicos utilizados para detectar enterotoxinas estafilocócicas consistem na administração da toxina por via intragástrica em macacos e por via intraperitoneal ou intravenosa em gatos, confirmando a

potencialidade dessas enterotoxinas através do desenvolvimento clínico de emese. Esses ensaios biológicos são úteis, pois a enterotoxina presente nos alimentos suspeitos, quando não detectada por nenhum outro método laboratorial, pode ser identificada quando inoculada em animais (BERGDOLL, 1979).

As enterotoxinas estafilocócicas são diferenciadas através de suas características antigênicas em: A(EEA), B(EEB), C1(EEC1), C2(EEC2), C3(EEC3), D(EED), E(EEE), G(EEG) e H(EEH) e são consideradas superantígenos pelo fato de estimular as células linfocitárias e as polimorfonucleares aumentando a capacidade de liberação de hormônios de defesa (citocinas, linfocinas e interleucinas), que ativam cinco tipos diferentes de linfócitos T, responsáveis pelas respostas inespecíficas e outras funções quimiotáticas (JETT e col., 1994).

Essas enterotoxinas caracterizam-se por apresentar cadeia polipeptídica simples, não ramificada, com peso molecular variando de 27.000 a 30.000 Daltons. No estado ativo são resistentes às enzimas proteolíticas como tripsina, quimiotripsina, renina e papaína (ADESIYUN e col., 1984) e são consideradas muito resistentes ao calor pelo fato de sua toxicidade não ser totalmente destruída após fervura por 30 minutos em meio de cultura (BERGDOLL, 1979).

Dadas as suas diferenças antigênicas as enterotoxinas podem ser identificadas em alimentos através de ensaios sorológicos, utilizando anticorpos específicos. Dentre os testes mais utilizados está a imunodifusão em lâmina

capaz de detectar em extratos de cultura pura, valores de até 100ng de toxina/ml (BERGDOLL e col., 1965), o que torna o método pouco sensível. Outro método, como o ensaio imunoluminométrico, baseado na utilização de anticorpos reveladores conjugados ao isoluminol, é bastante sensível, detectando até 1 ng de enterotoxinas por ml (LOHNEIS e col., 1987). No entanto, também detecta traços de interferentes presentes no extrato do alimento, diminuindo e comprometendo a resolução da reação, o mesmo acontecendo com o RPLA "Reversed Passive Latex Agglutination" (PARK & SZABO., 1986, IGARASHI e col., 1986) e o RIA, "Radio imunoensaio"(COLLINS e col., 1972, JOHNSON e col., 1971).

Os métodos acima citados são relativamente efetivos pois necessitam que o material a ser analisado esteja purificado, sem nenhum interferente, o que não acontece com o "E.I.E" Ensaio Imuno Enzimático, que revela a presença de até 0,1 ng de enterotoxinas presentes no alimento. Esse tipo de EIE denominado de "duplo sanduíche", revela e quantifica a presença de uma determinada toxina específica, mesmo que essa se encontre no seu estado bruto. Isso se deve à especificidade atribuída ao método que utiliza dois anticorpos anti-toxina espécie-específicos (FEY e col., 1984; FREED e col., 1982; EDWIN e col., 1986; ENGVALL & PERLMANN, 1972).

Diante de casos de suspeita de intoxicação é importante a escolha de um método de detecção da toxina que seja sensível, específico, de fácil execução e rápido. Estas são as características dos ensaios imunoenzimáticos (BERGDOLL, 1991), ou seja:

Alta sensibilidade de detecção (ao redor de 0.1ng de toxina por g); especificidade na identificação das diferentes enterotoxinas, dada a possibilidade da utilização de anticorpos específicos; identificação da toxina diretamente no extrato do alimento, dispensando o isolamento do microrganismo produtor em meio de cultura, utilização do ensaio para outros extratos que não o alimento e, diminuição no tempo de diagnóstico.

III. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi a produção e purificação da enterotoxina estafilocócica do tipo B, a partir da linhagem de *S.aureus* S6, utilizada na imunização de coelhos e cobaias para a obtenção de anticorpos policlonais.

Padronização de um ensaio imunoenzimático indireto do tipo "duplo sanduíche", capaz de detectar a enterotoxina do tipo B, produzida por algumas linhagens de estafilococos; diretamente de extratos de alimentos.

IV. Revisão Bibliográfica

IV.1. Classificação do Gênero *Staphylococcus*.

Segundo a 12ª edição do Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey (SCHLEIFER, 1986), o gênero *Staphylococcus* faz parte da família *Micrococcaceae*, que abriga três outros gêneros ou seja : *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*.

KONEMANN e col., em 1992 classificaram dentro do gênero *Staphylococcus* 28 espécies, sendo 14 freqüentemente encontradas em casos clínicos em humanos. (*S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.chleiferi*, *S.warnari*, *S.simulans*, *S.capitis*, *S.auricularis*, *S.cohnii*, *S.xylosus*, *S.sacharolyticus*), outras 10 espécies isoladas em infecções animais (*S.hycus*, *S.chremogenes*, *S.sciuri*, *S.gallinarum*, *S.intermedius*, *S.lentus*, *S.caprae*, *S.equorum*, *S.delphine*, *S.felis*) e as últimas 4 isoladas em alimentos processados, (*S.carnosus*, *S.caseolyticus*, *S.kloosii*, *S.arlettae*).

Esses mesmos autores relatam que as principais espécies de *Staphylococcus* patogênicos em humanos e animais, produzem a enzima coagulase, que é utilizada na identificação laboratorial desses microrganismos. *S.epidermidis* e *S. saprophyticus*, embora sejam duas espécies coagulase negativas têm sido encontradas freqüentemente em infecções purulentas em humanos. A coagulação do plasma de coelho é uma característica de *S.aureus*, *S.intermedius* e *S.hycus*, e essas mesmas espécies também produzem a desoxiribonuclease termoresistente que eram utilizadas como indicadores de

enterotoxigenicidade. Porém, existem espécies coagulase fracamente positivas como *S.carnosus*, *S.simulans*, *S. hycus* sub-espécie *chromogenes*.

Na última classificação do "International Journal of Systematic Bacteriology" (SCHLEIFER e col., 1990) o gênero *Staphylococcus* agrupa 28 espécies e oito sub espécies : *S.warneri*, *S.capitis*, *S.homonis*, *S.simulans*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.cohni*, *S.haemolyticus* e *S.xylosus*, *S.intermedius*, *S.saccharolyticus*, *S.caseolyticus*, *S.carnosus*, *S.sciuri*, *S.lentus*, *S.auricularis*, *S.gallinarum*, *S.caprae*, *S.aelletae*, *S.equorum*, *S.kloosii*, *S.aureus* sub espécie *anaerobius*, *S.hycus* sub-espécie *S.chromogenes*, *S.lugdunensis*, *S.schleiferi*, *S.delphini*, *S.felis*, *S.capitis* sub-espécie *ureolyticus*, *S.schleiferi* sub-espécie *coagulans*, *S.cohnii* sub-espécie *S.cohnii* sub-espécie *urealyticum* (SCHLEIFER e col., 1990).

Basicamente o *Staphylococcus aureus* se diferencia de outras bactérias do mesmo gênero graças à composição do DNA, à estrutura química da parede celular, à produção das enzimas coagulase, Tnase (termunuclease) termoresistente ou desoxiribonuclease termoresistente (PARK e col., 1980), além da sua capacidade de produção de hemolisinas (DEBRIESE, 1980).

IV.2. Propriedades fisiológicas e bioquímicas do *Staphylococcus aureus*.

Os estafilococos são microrganismos Gram positivos, anaeróbios

facultativos, catalase fortemente positivos, não móveis, não fotossintéticos e não formadores de esporos. São microorganismos mesófilos, com a temperatura ideal de crescimento a 37°C, mas algumas linhagens se desenvolvem melhor a 39°C e 40°C, a temperatura mínima de crescimento para algumas cepas é 10°C (BERGDOLL, 1979).

Algumas linhagens de *S.aureus* produzem cápsula de exopolissacarídeo que impedem sua lise por células de defesa polimorfonucleares. Tendo sido isolados oito tipos destes antígenos capsulares (KONEMANN e col, 1992).

A maioria das cepas de estafilococos crescem em presença de antibióticos como bacitracina, penicilina e polimixina e são inibidas por furazolidone (KONEMANN e col., 1992). Muitas linhagens produzem pigmento amarelo ou alaranjado e, normalmente, crescem em meios contendo 15% de NaCl (CASMAN e col., 1963; BERGDOLL, 1979). As linhagens patogênicas apresentam maior tolerância aos sais, como o cloreto de lítio, telurito de potássio, cianetos e azida sódica e algumas linhagens crescem a uma concentração de 20% de NaCl a faixa de pH ótimo de crescimento encontra-se no intervalo entre 6,0 e 7,0, podendo, no entanto, situar-se numa faixa de pH entre 4,0 e 9,8 (BERGDOLL, 1979).

As diferentes hemolisinas estafilocócicas, como a α e β -hemolisinas, são letais às células de defesa, do tipo polimorfonucleares, causam lise dos eritrócitos e são também potentes neurotoxinas (KONEMANN, e col., 1992). As

δ -hemolisinas agem primariamente como surfactantes e causam a ativação da adenilciclase, o que resulta na ativação da adenosina monofosfato que age de maneira semelhante à toxina do cólera, causando diarreias profusas.

Em meios de cultura utilizados para o crescimento é necessário a presença de aminoácidos como fonte de nitrogênio, e algumas vitaminas como cofatores (DAVIS e col., 1970). Para produção das enterotoxinas são necessárias a presença de tiamina e niacina ou extrato de levedura aos meios de cultura. A fim de se isolar os estafilococos, utiliza-se o meio de Baird Parker (BP) acrescido de cloreto de sódio, solução de gema de ovo e telurito de potássio. A gema de ovo é utilizada para verificar a presença da enzima lecitinase, que ao hidrolisar a lecitina do ovo promove à formação de halos de transparência ao redor das colônias. A característica negra das colônias de *Staphylococcus aureus* nesse meio se deve à capacidade da cepa de reduzir o telurito de potássio (BAIRD PARKER, 1962, 1979, 1990).

Um dos importantes fatores de crescimento dos estafilococos, e sua conseqüente produção de enterotoxinas, é o valor de atividade de água (aw). O limite mínimo de aw que não compromete o crescimento é de 0,84 (SCOTT, 1953). Porém, para a produção de enterotoxinas são necessários valores de aw maiores de 0,90 à 0,98, dependendo da cepa TROLLER, 1971 apud (BERGDOLL, 1979).

As condições atmosféricas também influenciam o crescimento do *Staphylococcus aureus*. Quanto menor a tensão de oxigênio presente mais lento o crescimento e a produção de enterotoxinas (ADESIYUN e col., 1984). Em condições anaeróbias também foi evidenciada a produção de enterotoxinas,

segundo experimento desenvolvido em carnes curadas (GENIGEORGIS, 1989).

IV.3. Estafilococos enterotoxigênicos

Muitas pesquisas foram realizadas visando caracterizar as linhagens produtoras de enterotoxinas com o simples uso de ensaios bioquímicos. Porém, até o presente momento, nenhum dos ensaios bioquímicos conhecidos foi suficientemente eficaz para confirmar a identidade de linhagens de *Staphylococcus aureus* produtoras das enterotoxinas A, B, C, D, E, G e H.

A freqüente associação entre as linhagens produtoras de Dnase termoresistente e coagulase em linhagens produtoras de enterotoxinas, levou alguns pesquisadores a adotar a presença dessas enzimas como critério de identificação (SPERBER & TATINI 1980, BENNET & McCLURE 1976)

DANIELSON & HELBERG (1977) observaram a produção de enterotoxina A, B e C por linhagens de estafilococos coagulase negativos. LOTTER & GENIGEORGIS (1975, 1977) observaram linhagens coagulase negativas, produtoras de enterotoxinas que, originalmente, foram classificadas como estafilococos atípicos, pois não poderiam ser classificadas como *S.aureus*, *S.epidermidis* ou *S.saprophyticus*. Pesquisas desenvolvidas por FUKUDA e col. em 1984 verificaram que 24% das 210 linhagens de *S. intermedius*, isoladas de cachorros, coagulase e Tnase positivos, produziam enterotoxina A, B ou C.

Alguns trabalhos apontam para o fato de que a produção de enterotoxinas e de enzimas é similarmente afetada por fatores como pH, temperatura, atividade de água e outros (BERGDOLL, 1979), atualmente, nenhuma característica bioquímica pode ser utilizada como único parâmetro

para classificar linhagens de *S. aureus* como produtoras de enterotoxinas (GENIGEORGIS, 1989).

IV.4. Enterotoxinas estafilocócicas

IV.4.1. Estrutura molecular

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas constituídas por cadeias polipeptídicas curtas, apresentando um número médio de aminoácidos ao redor de 230, com peso molecular variando de 27.500 a 30.000 Daltons. São solúveis em água e contêm grande quantidade de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina. Possuem dois resíduos de meia cisteína e um ou dois resíduos de triptofano. Os resíduos de cisteína formam alças de pontes dissulfeto (BERGDOLL, 1979).

A enterotoxina D apresenta 2 resíduos de metionina, da mesma forma que a enterotoxinas A e E, mas difere das enterotoxinas B e C que contêm de 8 a 9 resíduos deste aminoácido. Já, para as enterotoxinas A e E, observa-se uma seqüência de 26 resíduos em comum e para as enterotoxinas B e C 16 resíduos. O resíduo C-terminal da enterotoxina A é a serina (BERGDOLL, 1970), da enterotoxina B é a lisina (BERGDOLL & col., 1965; SPERO e col., 1965), da

enterotoxina C₁ e C₂, a glicina (HUANG e col., 1976) e treonina para a enterotoxina E (BORJA e col., 1972)

A grande semelhança na composição de aminoácidos entre as enterotoxinas dificulta sua identificação por métodos sorológicos. Alguns testes evidenciam reações cruzadas que são atribuídas à similaridade entre as enterotoxinas do grupo C e B (HUANG e col., 1976).

Pesquisa desenvolvida por JETT e col. (1994), demonstrou que a EEB sintética possui vários domínios constituídos por seqüências de aminoácidos que desenvolvem ações específicas no hospedeiro, a saber: seqüência de 1-30, envolve reações com o complexo de histocompatibilidade de classe II, de 61-92, seria a seqüência responsável pelo sítio de ligação com o receptor de célula T, de 93-112, é uma seqüência linear que corresponde á alça de cisteína e de 130-160, seqüência que se mantém altamente conservada .

Pesquisas revelam que as enterotoxinas A, B e C são constituídas por seqüências parciais de aminoácidos homólogos, e que, entre EEB e EEC existem cinco áreas de homologia e somente uma entre as enterotoxinas A e B. Essas áreas de homologia contêm cinco resíduos de aminoácidos idênticos e a elas atribui-se o sítio tóxico da molécula (BERGDOLL, 1979).

A enterotoxina B é constituída de 239 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 28.300 Da e apenas dois resíduos de cistina, localizados no centro da cadeia, nas posições 92 e 112. Uma vez que não há grupos sulfidrilas livres, as duas meia cisteínas estão unidas formando uma alça de cistina, comum a todas as enterotoxinas, porém a seqüência de aminoácidos das alças é

variável para cada enterotoxina (BERGDOLL, 1972).

Através da digestão pela tripsina, a EEB tem sua cadeia peptídica quebrada em dois fragmentos de 17.000 D e 11.500 (SPERO,1976), enquanto para EEC três peptídeos são originados, de 19.000, 6.500 e 4.000 Da.

SPERO & MORLOCK em 1979, observaram que anticorpos policlonais produzidos contra a enterotoxina B, reagiam mais efetivamente com o fragmento de maior peso molecular, o mesmo acontecendo com a enterotoxina C. Sendo assim, é provável que o fragmento carboxi-terminal contenha o epítipo acessível à toxina nativa e, conseqüentemente, induz a resposta imune.

IV.4.2. Produção e síntese das enterotoxinas estafilocócicas

A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* depende da natureza genética de sua síntese e das características físicas e químicas do meio(BERGDOLL, 1979, 1990).

Segundo TRANTER(1990) e BAIRD PARKER (1990), a síntese das enterotoxinas está associada a genes plasmidiais ou cromossômicos. A produção das enterotoxinas B e C está ligada a plasmídios e, algumas vezes, a enterotoxina B pode estar associada a genes cromossômicos. Nestes casos a sua produção ocorre na fase estacionária do crescimento. A síntese das enterotoxinas A e E é controlada por genes cromossômicos e sua produção ocorre durante a fase logarítima do crescimento. Já síntese da enterotoxina D é

controlada por plasmídio.

TATINI, (1973) pesquisou os aspectos físicos, disponibilidade de oxigênio e temperatura, conceituando-os como fatores limitantes. A temperatura é, sem sombra de dúvida, um fator limitante na produção de enterotoxinas. Constatou-se que na extensa faixa de 10°C a 46°C pode ocorrer produção das enterotoxinas estafilocócicas, sendo que o ideal registrado foi a temperatura de 40°C.

Em 1973 VANDERBOSH e col., obtiveram a produção máxima de enterotoxina B através da cepa S6 e, pesquisas desenvolvidas no Food Research Institute com a cepa 137 produtora da enterotoxina A, confirmaram sua alta produção.

Em 1982 PEREIRA e col., relatam 39,5°C como sendo a temperatura ótima para a produção das enterotoxinas A e B em meio de cultura líquido. Já MAC LEAN e col., (1968), demonstraram que uma cepa produtora de enterotoxina B, quando incubada entre 16°C e 20°C, produziria de 10µg a 20µg/ml enquanto que a 36°C produziria 340µg/ml. Experimentos mostram que pode ocorrer produção de enterotoxinas entre 25°C a 30°C porém, em menor quantidade (TATINI e col., 1976).

Pode-se observar tanto o crescimento quanto a produção de enterotoxina em condições aeróbicas e anaeróbicas, fato esse documentado por GENIGEORGIS e col, em 1969, confirmando o crescimento do *S.aureus* em anaerobiose, seguido de produção de enterotoxina B em carnes curadas.

Pesquisas desenvolvidas por BARBER e DEIBEL em 1972, demonstraram que há produção de enterotoxinas tanto na ausência de oxigênio como na sua presença.

O pH de um determinado meio depende da concentração de sais e componentes do mesmo. Foi determinado que para haver maior crescimento e produção de enterotoxinas o meio de cultura deve apresentar um pH entre 7,0 a 7,5. BARBER & DEIBEL (1972) demonstraram que há produção de enterotoxinas mesmo em pH entre 4,5 a 7,0. (TATINI e col., 1975, 1976) observaram que o tipo de ácido utilizado na acidificação do meio de cultura altera a produção de enterotoxinas. Ensaio com o pH variando de 4,5 a 6,4 demonstraram que não há alteração na produção de enterotoxina A. Por outro lado, quando o pH é obtido com ácido láctico para 4,5 não foi observado crescimento bacteriano. Já a pH 5,0 a enterotoxina foi produzida. A um mesmo pH, o ácido acético mostrou-se mais bactericida que o ácido cítrico, ácido láctico e ácido tartárico (NUNHEIMER & FABIAN 1940).

DUNCAN e col. em 1972, puderam observar que a adição de glicose no meio de cultura inibia a produção de enterotoxinas, pois os produtos liberados durante o metabolismo da glicose acarretavam um abaixamento do pH. Níveis elevados de toxina foram conseguidos em meios tamponados com pH superior a 5,6.

A busca de um meio de cultura mais adequado para a produção das enterotoxinas foi iniciado por SURGALA e col.(1951) que sugeriram que o mesmo deveria conter digerido pancreático da caseína. Porém, atualmente, o meio

utilizado contém 3% de triptona e 1% de extrato de leveduras, tanto para fins de identificação de linhagens, quanto para a produção das enterotoxinas (MELCONIAN e col,1983).

A produção de enterotoxinas sofre alterações com o acréscimo de sais aos meios de cultura. Se a concentração de NaCl é aumentada a 4%, em meios com pH 6,0, após 72 horas de incubação há um decréscimo na produção da enterotoxina B em 89,5% e, sob essas mesmas condições não foram observadas a produção da enterotoxina A (PEREIRA e col., 1982). Porém, se forem adicionados íons magnésio ao meio de caseína hidrolizada observa-se um estímulo na produção das enterotoxinas C e B, mas não na síntese da enterotoxina A. A adição de Fe⁺⁺ aumenta a síntese da enterotoxina B, mas não altera os níveis de produção das enterotoxinas A e C. A adição de íons de magnésio, fósforo e potássio aumenta em duas vezes a produção da enterotoxina B (KELLER e col., 1978).

IV.4.3. Estabilidade das enterotoxinas estafilocócicas

A estabilidade das enterotoxinas estafilocócicas foi intensamente estudada frente a inúmeros fatores. Determinando-se suas propriedades as mesmas se mantêm ativas mesmo com a aplicação de calor, radiações e frente a enzimas proteolíticas (BERGDOLL, 1979).

A resistência térmica foi comprovada quando as enterotoxinas foram

submetidas à fervura por 30 minutos em pH 6,0 e 7,5 e ainda apresentaram atividade emética e diarreica quando aplicadas em *Macacos rhesus* (ADESIYUN e col. 1984).

SCHANTZ e col. (1965), observaram que com aquecimento a 100°C por 5 minutos a enterotoxina B mantinha 50% de sua atividade biológica. Ensaio desenvolvido em solução tampão fosfato de sódio pH 7,2 à 100°C e 80°C por 10 minutos, mantinham 65% da atividade biológica da enterotoxina A, enquanto a enterotoxina do tipo B mantinha 35% de sua atividade. TRANTER e col., (1990) constataram que a perda de atividade biológica é maior a 80°C do que a 90°C e 100°C.

Alguns estudos evidenciam que as enterotoxinas, após terem sido completamente inativadas por tratamento térmico, podem recuperar sua atividade biológica e imunológica com o abaixamento brusco do pH 11,0 para pH 7,0 (SCHWABE e col., 1990).

Para que haja inativação das enterotoxinas, doses radioativas de 5 Mrd são necessárias para a redução de 90% na atividade da enterotoxina B em tampão veronal, necessitando-se de uma dose quatro vezes superior para o mesmo efeito quando presentes em leite. (READ & BRADSHAW, 1967).

As enterotoxinas no estado ativo são resistentes às enzimas proteolíticas como tripsina, quimiotripsina, renina e papaina e não resistentes a ficina. (BERGDDOLL, 1972)

IV.4.4. Ação biológica das enterotoxinas

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma patogenia que ocorre devido à ingestão de enterotoxina pré-formada em alimentos contaminados. É uma enfermidade gastrointestinal aguda com presença de náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e prostração, que ocorrem em um período médio de 4 horas após a ingestão do alimento contaminado. Esses sintomas se manifestam conjuntamente ou alternados, como náuseas, vômitos e prostração ou ainda, cólicas abdominais, diarreia e prostração, sendo que o modo de ação da enterotoxina no homem não está completamente esclarecido (BERGDOLL, 1979). Outros sintomas como queda da pressão sangüínea e elevação da temperatura corporal também foram observados, indicando a passagem das enterotoxinas do estômago e trato intestinal para a corrente sangüínea (BERGDOLL, 1990a).

A emese, ou vômito é o mais freqüente sintoma causado pelas enterotoxinas, pois elas atuam nos receptores nervosos do centro do vômito, distribuídos ao longo das vísceras abdominais, transmitindo estímulos via vago e nervos simpáticos (BERGDOLL, 1970).

Estudos indicam que diferentes sítios das enterotoxinas B e C são responsáveis pelo desencadeamento de diferentes atividades biológicas. O fragmento ou porção amino-terminal da proteína induz o efeito mitogênico, enquanto que a porção carboxi-terminal é responsável pela emese. SPERO & MORLOCK (1978), fracionaram a enterotoxina C1 com tripsina e avaliaram as

diferentes ações dos fragmentos obtidos. O maior, com peso molecular de 22.000 Da, desenvolveu forte ligação com o antissoro. Quando esse fragmento foi inoculado em macacos esses apresentaram vômitos. Já o fragmento de 6500 Da quando inoculado em cultura de células de rato, apresentou ação mitogênica e não desenvolveu atividade emética em macaco. O fragmento de 22.000 Da não resultou em atividade mitogênica.

A administração das enterotoxinas por via oral, via intravenosa ou intraperitoneal em macacos, gatos e cobaias tem sido freqüentemente utilizada, mas o animal que apresentou sintomas semelhantes ao do homem foram os macacos, *Macaca mulatta* (VARADARAJ & RANGANATHAN, 1989).

SURGALA e col., (1951), demonstraram que dentre os inúmeros compostos produzidos pelo estafilococos, somente as enterotoxinas provocavam vômitos em macacos, sendo que outros produtos não interferiam nos resultados do teste, não havendo necessidade de tratamento da amostra antes de ser administrada em animais.

Outros estudos indicam que a EEB é citotóxica em células hepáticas humanas e exibem a capacidade de modificar o metabolismo dessas células, alterando os níveis de ciclogênase e lipoxigenase metabólicas pela via do ácido araquidônico, além de poder contribuir para inflamação, edema e Choque Tóxico Letal (BOYLE e col.1994, JETT e col. 1990, PARSONNET 1989).

A EEB é considerada um super-antígeno pelo fato de desenvolver diferentes respostas imunológicas no hospedeiro, caracterizadas pela ação mitogênica nos linfócitos T, "in vivo" ou "in vitro". A administração prolongada

de enterotoxinas resulta em debilidade, atrofia tímica e também profunda imunodeficiência, provavelmente secundária, em níveis cronicamente elevados de produção de citocinas (ABBAS 1995).

Em decorrência do estímulo aos linfócitos T e macrófagos pela enterotoxina B, ocorre a produção e liberação de mensageiros químicos, como o interferon, as linfocinas e interleucinas 1, 6 e 11, o fator de necrose tumoral(TFN); o fator de coagulação intravascular disseminada(CID) e outras substâncias quimiotáticas (ABBAS,1995). As citocinas são, provavelmente as responsáveis pelas reações sistêmicas como febre e coagulação intravascular disseminada (ABBAS, 1995).

BEAN e col., em 1993, estudaram a habilidade da interleucina 10 (IL-10) proteger camundongos contra choque tóxico letal causado pela administração de EEB. Tratamento com IL-10, impediu a morte de animais que receberam EEB, quando esta foi administrada antes ou durante a aplicação da EEB, mas foi pouco efetiva quando aplicada após a administração da enterotoxina B. Esta observação indicou que IL-10 é capaz de regular a célula T "in vivo" .

CHAPES, 1993 e col., observaram que em camundongos sensibilizados pela EEB que a resposta imune não dependia da ação dos macrófagos pela células específicas apresentadoras de antígeno, pois os linfócitos T podem ser ativados diretamente pela presença de mediadores químicos do sistema de defesa como a interleucina 10.

IV.4.5. Purificação das enterotoxinas

Ensaio realizado para purificar as enterotoxinas estafilocócicas tiveram início em 1959 por BERGDOLL e col, e consistiam, basicamente, na precipitação ácida da enterotoxina, seguida de adsorção em alumina, precipitação alcoólica e aplicação em coluna com resina Amberlite IRC-50 e posterior eletroforese em gel de amido. Esse método foi abandonado por levar a uma desnaturação parcial da enterotoxina e conseqüente perda no rendimento.

Uma grande evolução foi o método de separação proposto por SCHANTZ e col. em 1965, onde se utilizavam duas cromatografias de troca iônica e uma filtração em gel. Na primeira etapa, a enterotoxina foi adsorvida em resina Amberlite CG-50, a segunda em carboximetilcelulose e a terceira etapa a enterotoxina foi purificada por filtração. Esses métodos sofreram modificações com a utilização da resina de ácido carboxílico CG-50, carboximetilcelulose, hidroxiapatita e filtração em gel Sephadex A-50 (ROBERN e col., 1975) e, para a purificação da enterotoxina estafilocócica do tipo B SCHANTZ e col., 1965, ROBERN e col., 1975 usaram Sepharose "Fast Flow" para troca-iônica e Sephacryl S-200 HR para filtração em gel. Com esse método, atingiu-se um rendimento de 99%, e bom estado de pureza para a enterotoxina do tipo B.

Para a purificação de enterotoxinas em soluções onde sua concentração é baixa, pode-se utilizar o método de focalização isoelétrica, que tem como princípio a separação da proteína através dos diferentes pontos

isoeletricos (ROBERN e col. 1974, METZGER e col., 1972), em combinação com cromatografia em resina de troca iônica Amberlite CG-50 e filtração em gel Tanto a enterotoxina B como a C podem ser purificadas por esse método. (ENDE e col., 1983)

Outra metodologia proposta foi a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (High Pressure Liquid Chromatography HPLC) preconizada por WILLIAMS e col., 1983, que purificou a enterotoxina B e observou que a mesma apresentava contaminações com proteínas de baixo peso molecular. Após desnaturação com dodecil sulfato de sódio (SDS) um alto índice de purificação foi obtido. Posteriormente, STRIKLER e col., em 1979, desenvolveram um método rápido para purificação de enterotoxinas empregando HPLC de fase reversa, e posteriormente, recromatografaram por HPLC de troca iônica, obtendo-se uma recuperação da proteína de aproximadamente 50%.

REYNOLDS e col. em 1988 descreveram um método simples de purificação, no qual o corante sintético Tiazina "REDa" é acoplado à matriz suporte de agarose. O uso de cromatografia de afinidade ligado a corante tem sido aplicado para a purificação das enterotoxinas A, B e C1 em larga escala (BRENM e col., 1990).

Somente após sua purificação é possível avaliar a natureza química e imunológica das enterotoxinas estafilocócicas. A reatividade imunológica é um estudo que depende da identificação dos seus determinantes antigênicos, dados pelas diferentes seqüências de aminoácidos, capazes de estimular resposta imune do hospedeiro.

IV.4.6. Reatividade sorológica

As enterotoxinas estafilocócicas apesar do baixo peso molecular são imunogênicas, ou seja, capazes de estimular a resposta imunológica com formação de anticorpos e de interagir com eles. Possuem um número grande de sítios de homologia entre elas, que são definidos pelas seqüências idênticas de aminoácidos, em determinadas porções das moléculas (JONES e col., 1990). A similaridade nas seqüências de aminoácidos é maior entre as enterotoxinas do mesmo grupo, como é o caso das enterotoxinas do grupo C (C₁, C₂ e C₃) (BERGDOLL, 1990).

As enterotoxinas A, B, C, D e E contêm mais de um determinante antigênico. No caso da enterotoxina C, existem dois sítios antigênicos no grupamento carboxiterminal e um outro no grupamento amino terminal (LEE e col., 1980). Esses mesmos autores observaram que as enterotoxinas C₁ e C₂, quando utilizadas para a produção de anticorpos, induziam a reatividade cruzada. Em outras palavras anticorpos anti-EEC₁ frente à EEC₂, desenvolviam reação cruzada ou de identidade parcial. O mesmo aconteceu quando anticorpos anti-EEB eram colocados para reagir com as enterotoxinas C₁ e C₂. (LEE e col., 1980)

LEE e col., (1984) verificaram que as enterotoxinas C₁ e C₂ reagem com o mesmo anticorpo principal, porém, cada uma tem seu anticorpo secundário específico. A enterotoxina C₃ reage com seu anticorpo principal, mas a reação

indica que os sítios antigênicos responsáveis por esta reação, não são idênticos aos sítios das outras toxinas do grupo C. A EEC3 tem serina como resíduo N-terminal, ao passo que EEC1 e EEC2 têm ácido glutâmico com resíduo N-terminal, apresentando serina como o próximo resíduo na seqüência de aminoácidos (SCHMIDT e col., SPERO & MERLOCK, 1983).

Reações cruzadas acontecem também entre a EEE e a EEA, que estimulam a produção de um anticorpo principal e anticorpos secundários comuns às duas enterotoxinas evidenciando grande similaridade na composição de seus aminoácidos. (BERGDOLL, 1979).

Foram observadas reações cruzadas entre as enterotoxinas A e E, tanto com os anticorpos principais quanto com os anticorpos secundários. A enterotoxina D não apresenta reatividade cruzada com anticorpos comuns a enterotoxinas A e E, porém existem evidências de que alguns anti-soros nativos devam conter anticorpos que reajam com as três enterotoxinas (BERGDOLL, 1990). Anticorpos monoclonais preparados contra enterotoxina A reagem fracamente com as enterotoxinas B, C e D, e mais fortemente com a enterotoxina E quando utilizado o método do ELISA indireto (EDWIN e col. 1986)

Outras pesquisas realizadas por SPERO e col, (1978), confirmaram a ocorrência de reações cruzadas entre as enterotoxinas B e C. Porém, a concentração de anticorpos necessária para as reações heterólogas é quatro vezes maior do que para a série homóloga. O determinante antigênico principal de uma enterotoxina possui similaridade com o de outra, mas não possui

estrutura idêntica.

Fragmentos das enterotoxinas B e A, obtidos após hidrólise com tripsina e colocados frente ao anti-soro produzido contra a toxina nativa, (ou toxina bruta), desenvolveram reações cruzadas (SPERO & MORLOCK, 1978). Estes mesmos autores desenvolveram trabalhos com o objetivo de avaliar a ação da enterotoxina quando fragmentada e a reatividade imunológica de cada um dos fragmentos, e em todos os trabalhos tentaram avaliar o número de determinantes antigênicos e qual a ação de cada um deles.

JETT e col, em 1994, desenvolveram pesquisas para definir a relação da estrutura das enterotoxinas e suas várias atividades biológicas, enfocando primeiramente a ativação dos linfócitos T. Esses estudos indicam que mais de uma região da toxina está envolvida na ativação da célula T.

A proliferação das células T também foi atribuída ao fragmento amino terminal da enterotoxina C (BOHACH & col.,1989) e ao péptido amino terminal da enterotoxina estafilocócica A (PONTZER e col.,1989).

Outros estudos, entretanto, revelaram que sua capacidade de induzir a proliferação de células T e pirogenicidade, estariam associados ao agrupamento carboxiterminal no terceiro-quarto da EEC (BOHACH e col., 1989). Reconhecendo a capacidade imunogênica das enterotoxinas nativas, e de seus fragmentos, análises sorológicas podem ser utilizadas para a identificação das toxinas através de reações específicas Ag-Ac, apesar de constatar-se que reações cruzadas podem acontecer e que, no entanto,

podem ser eliminadas aumentando-se a especificidade dos métodos empregados.

IV.4.7. Métodos sorológicos de detecção de enterotoxinas

Os métodos sorológicos "in vitro" utilizados para identificar, separar e quantificar as enterotoxinas estafilocócicas tem se mostrado eficientes por possuírem maior sensibilidade de detecção, próxima a 0,1ng (BERGDOLL, 1991).

Entre as várias técnicas de imunoprecipitação em gel as mais empregadas são as Reações de Imunodifusão Simples em gel de agar ou agarose (ADESIYUN e col.1984, BERGDOLL, 1979). Essa técnica de difusão unidimensional "Oudin" foi o método mais utilizado para análises quantitativas das enterotoxinas a partir dos sobrenadantes de culturas. Também é usada para a quantificação de enterotoxinas nas diferentes fases de sua purificação e na determinação dos títulos de soros imunes, apresentando uma sensibilidade de detecção de 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina/ml (BERGDOLL,1991).

Já as reações de imunodifusão dupla podem ser usadas para determinar a relação entre diferentes antígenos e um determinado anticorpo. O limite de sensibilidade para o método situa-se ao redor de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ quando se utiliza o método de Ouchterlony para Placas de Ótima Sensibilidade *OSP*, proposto por ROBBINS, e col. 1974, enquanto que o método em microlâmina modificado por WADSWORTH e col., 1957 detecta 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina.

Devido as intoxicações alimentares acontecerem em função da produção de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* na concentração acima de 1 ng/ml, os níveis de sensibilidade dos testes acima descritos, estão abaixo das necessidades ideais de detecção da enterotoxina em alimentos, sendo que, os métodos mais sensíveis propostos atualmente são: Hemaglutinação Passiva Reversa (HPR), Radio Imuno Ensaio (RIA), Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA), Ensaio Imunoluminométrico (ILMA) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

O RIA , é um método muito sensível, pois detecta quantidade de até 0.1 ng/ml e o princípio da reação baseia-se na competição entre moléculas de enterotoxina marcadas com I_{125} e não marcada. As enterotoxinas marcadas e não marcadas competem com o sítio de ligação dos anticorpos que foram adsorvidos na parede interna dos tubos de poliestireno, quanto maior a concentração de enterotoxina menor a intensidade da reação radiante (BERGDOLL e col. 1983, COLLINS e col. 1972). Basicamente são dois os inconvenientes desse método. Devido a alta sensibilidade, os interferentes presentes no alimento ou nos meio de cultura semeados com o estafilococos, diminuem a resolução da reação, aliadas ao fato de se utilizarem substâncias radioativas com os riscos a elas inerentes, além da necessidade de uma infra-estrutura complexa e de elevado custo operacional.

No método de Hemaglutinação Passiva Reversa utiliza-se da adsorção de anticorpos específicos a hemácias tratadas com ácido tânico, seguida de aglutinação de células sensibilizadas com enterotoxinas. Esse método

apresenta uma sensibilidade de 0.1 µg/100 g de alimento. Neste método, o inconveniente é o surgimento de reações inespecíficas de aglutinação (SILVERMAN e col. 1968).

O ensaio conhecido como RPLA "Reversed Passive Latex Agglutination" utiliza adsorção de anticorpos específicos a partículas de látex, e sua sensibilidade é de 0,1 ng/ml. O inconveniente também é o desenvolvimento de reações inespecíficas de aglutinação, em especial em extratos obtidos em alimentos (BERGDOLL e col., 1983, IGARASHI e col., 1986).

Como já colocado anteriormente LOHNNEIS, e col, em (1987), verificaram que o ensaio imunoluminométrico, baseado na utilização de anticorpos reveladores acrescidos de isominol e peroxidase como conjugado, atingia alta sensibilidade, detectando até 0.1 ng de enterotoxina por ml do sobrenadante de cultura de estafilococos. O inconveniente foi a utilização desse método em alimentos, devido a presença de interferentes que comprometem sua resolução.

Tanto o "RIA", quanto Hemaglutinação Reversa, como "RPLA" Reversed Passive Latex e o "ILMA" Ensaio Imunoluminométrico possuem o mesmo inconveniente, a alta sensibilidade em detrimento da baixa especificidade.

Esse métodos quando empregados para detectar enterotoxinas em alimentos apresentam considerável número de reações falso positivas, devido aos interferentes do alimento.

Dentre os métodos sorológicos de quantificação da concentração de antígenos, o que possui maior especificidade e sensibilidade, é o

método de *ELISA*, ou *análise de imuno-adsorção por ligação enzimática*.

Existem diferentes métodos de *ELISA*, como: *ELISA* competitivo, *ELISA* simples e *ELISA* em sanduíche".

No método de *ELISA* que utiliza a técnica de inibição o antígeno é aderido ao suporte e, são adicionadas concentrações variadas de antígeno solúvel competidor e concentrações constantes de anticorpos marcados com a enzima. Incuba-se, removendo-se o excesso de anticorpo marcado e o antígeno solúvel por lavagem, medindo-se a quantidade de anticorpo marcado ligado. Diante de uma quantidade fixa de antígeno imobilizado, a quantidade de anticorpo marcado fixo diminui, a medida que é aumentada a concentração do antígeno a ser detectado na amostra, caracterizando uma reação por competição, que permite a quantificação do antígeno marcado. Quanto maior a concentração de antígeno na amostra, menor é a reação da imunoglobulina marcada com o antígeno fixado ao suporte (ABBAS, 1995).

O método de *ELISA* do tipo "duplo sanduíche" seguramente é o mais utilizado pois é mais sensível e mais específico do que os demais métodos sorológicos conhecidos. A grande sensibilidade do método é atribuída ao fato de se utilizarem dois anticorpos espécie-específicos diferentes contra um mesmo antígeno na reação (FEY e col., 1982, 1984 e FREED e col., 1982).

O experimento desenvolvido por FREED e col., em 1982 utilizou imunoglobulinas purificadas adsorvidas a três tipos de suportes, esferas, tubos e placas de poliestireno, sendo as esferas escolhidas, pois possibilitaram maior

quantidade de anticorpos ligados à fase sólida detectando desta forma todas as enterotoxinas.

Todos métodos possuem vantagens e desvantagens, porém o duplo sanduíche é atualmente o método mais recomendado e aparece como o mais viável para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.

FEY, 1984 e col, & FREED e col, 1982, foram unânimes em demonstrar que pode-se utilizar a toxina bruta, que não haverá diminuição da especificidade do teste, desde que se utilize o "duplo sanduíche" com dois anticorpos espécie-específicos diferentes. FREED e col., (1982) observaram também que não há interferência da proteína A dos estafilococos quando o suporte para a adsorção é tratado com soro bovino, a não ser quando houver uma grande concentração dessa proteína. Esse problema foi resolvido com tratamento da IgG com pepsina, que remove o fragmento Fc da molécula de IgG que se liga à proteína A. O único inconveniente neste caso seria uma diminuição na sensibilidade do teste FREED e col, (1982).

Já o método desenvolvido por ENGVALL e col, em 1972, foi do tipo ELISA competitivo, utilizando o antígeno para adsorção em tubos de poliestireno seguido da aplicação de antissoro e de uma solução preparada de anti-imunoglobulina conjugada a peroxidase.

V. Material e Método

V.1. Método

V.1. 2. Produção de enterotoxina estafilocócica do tipo B

A cepa de *Staphylococcus aureus* S6 produtora de enterotoxina estafilocócica B, cedida pelo Food Research Institute-EUA, foi reativada em meio de BHI (Brain Heart Infusion - Difco) e cultivada em 50 ml de meio a 37°C sob agitação de 210 rpm. Um total de 6 frascos tipo Fernback contendo 600ml de caldo triptona (Difco) a 3% e extrato de levedura (Difco) a 1%, foi inoculado com 5 ml da cultura reativada e incubada a 37°C por 48 h. O cultivo foi filtrado em uma unidade de ultrafiltração tangencial modelo Pellicon (Millipore), utilizando-se membranas de acetato celulose com porosidade de 0,25 µm de diâmetro (Millipore) e o extrato obtido foi diluído a 1:5 em água destilada e o pH ajustado para 5,6 com solução de HCl a 6 N .

A análise quantitativa da EEB nesse filtrado e em todas as outras etapas do processo foram monitoradas pelo método de dupla difusão em gel (OUCHTERLONY 1949) e as determinações das proteínas totais pelos métodos de biureto e de LOWRY (LOWRY e col.,1951).

V.1.3. Purificação da enterotoxina estafilocócica do tipo B

A enterotoxina B foi purificada através de duas cromatografias de troca iônica com as resinas Amberlite CG-50 (Mellinchröd Chemical Works) e CM-Sephadrose (Pharmacia) seguida por outra de exclusão molecular em Sephadex G-75 (Pharmacia).

Para a primeira cromatografia, a resina Amberlite CG-50 foi equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 5,6 e 50 ml foi adicionada ao filtrado, mantida sob agitação durante 2 horas a temperatura ambiente, para a adsorção da toxina. A resina foi empacotada em uma coluna de vidro de 3,0x25 cm e lavada com dois volumes de água destilada para a retirada de partículas não adsorvidas. A toxina foi eluída com 650 ml de tampão fosfato de sódio salino 0.5 M a pH 6,2. O eluído obtido foi concentrado em polietileno glicol 6.000 até o volume de 150 ml e dialisado em tampão fosfato de sódio 0,005 M.

Para a segunda troca iônica foi utilizada a resina CM-Sephadrose previamente equilibrada e empacotada em coluna de 1,6x40 cm, com tampão fosfato de sódio 0.05 M a pH 5,6. Os 150 ml do primeiro eluído foram aplicados a coluna e a toxina foi eluída com 200 ml de tampão fosfato de sódio 0.03 M pH 6,0, seguindo com 400 ml de tampão fosfato de sódio 0,045 M a pH 6,2. O eluído foi coletado no FRAC-100 (Pharmacia) programado para separação de frações de 5 ml e conforme o aumento do teor de proteínas o volume coletado programado passou para 3 ml.

As frações contendo 3ml foram agrupadas, concentradas até o volume de 2,0 ml, dialisadas em tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 6,2 e aplicada na coluna de exclusão molecular.

A exclusão molecular foi realizada com a resina Sephadex G-75 equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 6,8, contendo 0,5 M de NaCl e empacotada numa coluna de 1,6x100 cm. A fração protéica coletada correspondeu a um volume de 20 ml.

Após cada etapa da purificação, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo protéico pelo método de Lowry e a enterotoxina B por imunodifusão dupla em gel.

A eficiência e o grau de purificação da enterotoxina foi determinada através de técnica eletroforética em gel de poliacrilamina SDS-PAGE (LAEMMLI 1970).

V.1.4. Obtenção de soro anti enterotoxina estafilocócica do tipo B e determinação do título.

Foram utilizadas 2 fêmeas jovens de coelhos albinos, da raça Nova Zelândia, pesando de 2 a 3 k e duas cobaias jovens com peso médio de 600g.

A dose inicial para a imunização dos animais, foi preparada emulsionando-se 1 ml de solução contendo 200µg de EEB diluída em solução fisiológica em 1 ml de adjuvante completo de Freud.

Cada animal recebeu uma injeção contendo 0,5 ml da emulsão, na região interna do coxim plantar traseiro via subcutânea, de modo que coube a cada um 50 µg de EEB.

No 14º dia, as cobaias receberam a segunda dose contendo 50 µg de EEB emulsionada em adjuvante incompleto de Freud numa proporção de 1:1. A dose reforço dos coelhos foi de 50 µg de EEB emulsionada em adjuvante incompleto de Freud, seguindo as proporções anteriores, e foi inoculado no 21º dia após a primeira imunização.

A produção do anticorpo foi monitorada através da punção de 1 ml de sangue da via marginal da orelha dos coelhos e nas cobaias através da punção intracardíaca.

No 28º dia o soro das cobaias atingiu um título 1:32 considerado satisfatório e os animais foram sacrificados após sangria total. O soro dos coelhos atingiu um título de 1:32 no 42º dia, sendo então realizada a sangria total dos animais.

O título do soro imune foi definido como sendo a última diluição do soro que formou uma linha de precipitação visível quando ensaiada contra a EEB padrão.

O sangue foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos para a separação do soro, que foi titulado por imunodifusão dupla em gel de ágar noble.

O método da dupla difusão em gel foi realizado em placas de 50mm de diâmetro recobertas com 4,0 ml de ágar noble a 1,2% em tampão tris 0,05M pH

7,4. O ágar foi perfurado com o auxílio de um molde acrílico padronizado pelo F.R.I. (Food Research Institute) contendo seis orifícios. No orifício central foi aplicada a EEB padrão na concentração de 4 µg/ml e nos orifícios laterais menores o soro produzido nas diluições 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 sendo incubado a 37°C por 24 horas.

V.1.5. Purificação de IgG anti-EEB, obtidos em coelhos e cobaias

O método de purificação utilizado foi o fracionamento do antígeno a frio em banho de gelo com adição de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, até 35% de saturação, que foi adicionado lentamente sob agitação, durante duas horas; com a finalidade de se obter IgG anti enterotoxina B (HEBERT e col. 1973). Em seguida a solução foi centrifugada a 8.800 rpm por 10 min e o precipitado ressuspenso em solução salina 0.85%, para um volume de 34 ml igual ao volume original do soro. Repetiu-se o fracionamento com sulfato de amônio até a saturação de 35% sendo a solução novamente centrifugada e o sobrenadante removido. Após o último fracionamento, o precipitado foi ressuspenso em 2 ml de tampão fosfato de sódio 0.01M pH 7.2 contendo 0.85% de NaCl e dialisado no mesmo tampão até completa remoção do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Posteriormente o dialisado foi purificado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de 1.6 x 100 cm, contendo Sephacryl S-200 (Pharmacia) pré equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada a uma velocidade de

0.42 ml/minuto e as frações contendo IgG foram combinadas, concentradas e dialisadas em tampão fosfato de sódio 0.01M pH 9.6. A atividade do material obtido foi determinada por imunodifusão dupla em gel e conservado a -20°C.

V.2. Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) "duplo sanduíche" para a detecção de EEB.

A padronização do ensaio imunoenzimático para detecção de enterotoxina estafilocócica do tipo B, seguiu as seguintes etapas:

1-Determinação do título de uso da IgG de coelho anti cobaio conjugado a peroxidase;

2-Determinação do título de uso do soro de cobaias e IgG de coelhos anti-enterotoxina estafilocócica do tipo B;

3-Determinação da sensibilidade do ensaio para a detecção da enterotoxina B pura de estafilococos;

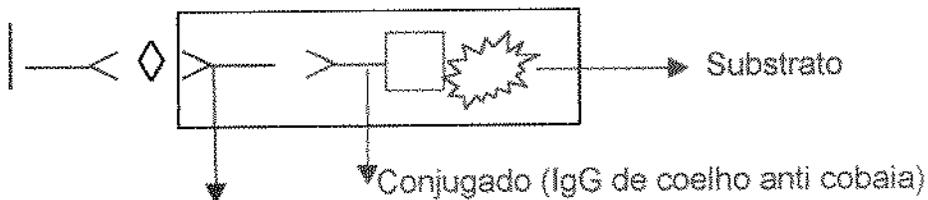
4-Determinação da sensibilidade do ensaio para a detecção da enterotoxina B de estafilococos em alimentos.

- **Ensaio Imuno-enzimático**



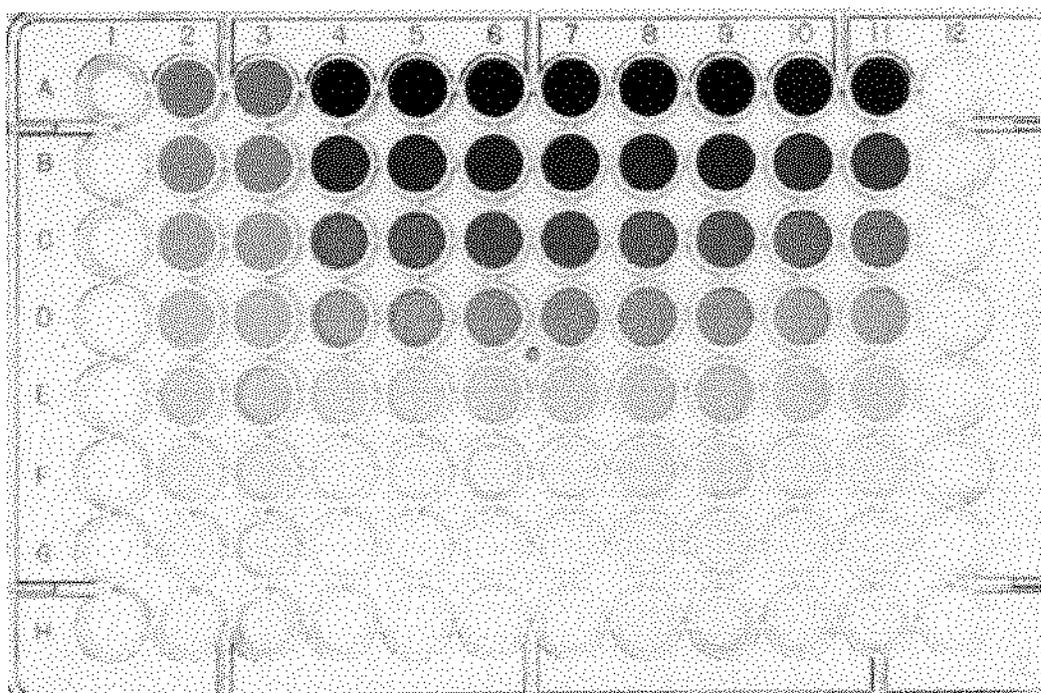
- Suporte
- IgG de coelho (Anticorpo de captura)
- EEB Enterotoxinas Estafilocócicas do tipo B
- Soro de cobaia (Anticorpo detector)
- IgG de coelho anti-cobaia conjugado a peroxidase
- Substrato (OPD + H₂O₂)

V.2.1. Determinação do título de uso do conjugado (IgG de coelho, anti-cobaia), conjugado a peroxidase.



- Soro de cobaia
- IgG de coelho anti-cobaia
- Substrato

Placa de Poliestireno (ELISA)



Esquema do ensaio de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D											Controle do substrato	
E												
F												
G												
H	Controle da Reação											

O conjugado anti-IgG de cobaia, produzido em coelho, foi comercialmente obtido (SIGMA). De acordo com as especificações do fabricante a diluição recomendada para uso deveria ser 1:40.000, para o teste realizado com a IgG de cobaia purificada.

No presente trabalho, o anticorpo a ser revelado não foi purificado, ou seja, utilizou-se na reação o soro total de cobaia após imunização com a enterotoxina B. Portanto, julgou-se conveniente titular esse conjugado frente ao soro total.

Sendo assim, o soro de cobaia foi diluído a 1:50; 1:100; 1:500; 1:1.000 e

1:2.000 em tampão carbonato-bicarbonato com 0,005M pH 9,6 e 100 µl de cada diluição foram aplicadas em placas de poliestireno para serem testadas em duplicatas, frente a diferentes diluições do conjugado. Isto é, a primeira diluição que correspondeu a 1:50, coube às colunas 1 e 2 e às colunas 3 e 4 coube a diluição 1:100, e assim sucessivamente, até as colunas 9 e 10 onde foi aplicada a última diluição. Após 18 horas a 4°C, a placa foi lavada três vezes com PBS/T (tampão fosfato salina 0,02M-Tween 20 a 0,2% pH 7,4) e em seguida todas as cavidades receberam 200µl de PBS/T/L (leite em pó desnatado a 2% diluído em PBS/T) para neutralizar todos os possíveis sítios de reação.

Após 1 hora a 37°C de incubação em câmara úmida, a placa foi novamente lavada com PBS/T.

O conjugado a ser titulado foi então diluído a 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 em PBS/T e cada uma dessas diluições foi testada frente às diluições do soro de cobaia. Após 1 hora de incubação nas condições já descritas, a placa foi novamente lavada e, em seguida, foi adicionado o substrato de revelação em todas as cavidades da placa. Esse substrato constituiu-se de 0,04% de OPD (ortofenilenodiamina) diluído em tampão ácido cítrico/fosfato 0,1 M pH 5,6 acrescido de 0,5% de H₂O₂ (30 volumes). Após aproximadamente 10 minutos, período para o aparecimento de cor âmbar, as reações foram interrompidas pela adição de 100µl de uma solução de H₂SO₄ 2 M.

Como controles do teste foram incluídas as seguintes reações:

Soro de cobaia + substrato

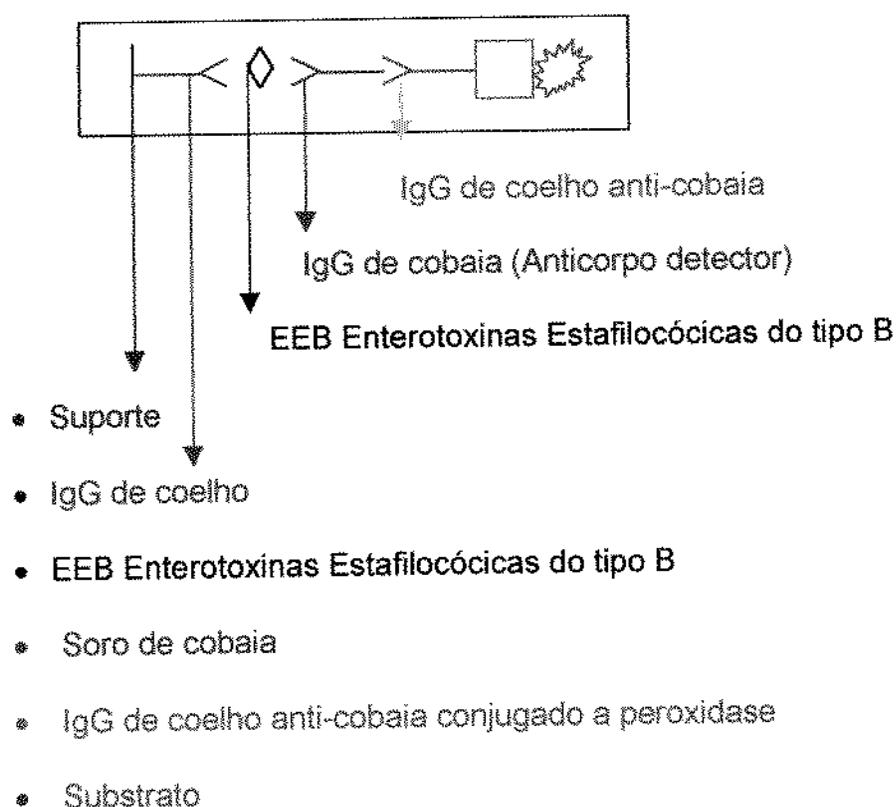
Conjugado + substrato

As colunas 11 e 12 da placa serviram como branco da reação, recebendo apenas o substrato.

A placa foi lida em espectrofotômetro Multiskan, a 492 nm, e o resultado foi obtido descontando-se as leituras de densidade óptica das reações do controle.

Para a definição do título de uso do conjugado, foi definida a leitura de D.O. maior ou igual a 0,200.

V.2.2. Determinação do título de uso do soro de cobaia e IgG de coelhos anti-enterotoxina estafilocócica do tipo B.



Para essa etapa foi utilizado o sistema de diluição em bloco, visando definir, ao mesmo tempo, o título do anticorpo de captura, ou seja, a fração IgG purificada obtida de coelhos imunizados com a enterotoxina B de estafilococos, e o título do anticorpo detector, ou seja, o soro de cobaia, também obtido após imunização com o mesmo antígeno.

Placas de poliestireno com 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 μ l do anticorpo de captura (IgG de coelho) diluído em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 a 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:800, 1:1.000 e 1:2.000. Cada 100 μ l da diluição 1:100 foi aplicada às colunas de 1 a 10 das fileiras A e B; nas fileiras C e D a diluição 1:200 do anticorpo de captura, e assim sucessivamente até a última diluição. Nas colunas 11 e 12 foi colocado apenas o diluente. Uma terceira placa, na sua totalidade, funcionou como controle das reações.

As placas foram incubadas por 18 horas e, em seguida, procedeu-se à lavagem por três vezes com PBS/T 0,02M pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, durante 2 minutos.

Em seguida, em todas as cavidades das placas foram acrescentados 200 μ l de uma solução 2% de leite em pó desnatado diluído em PBS/T (PBS/T/L), sendo incubadas por uma hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por três vezes com PBS/T.

A enterotoxina estafilocócica B (EEB) purificada e diluída em PBS 0,02 M pH 7,2 nas concentrações de 5ng, 10ng, 50ng e 100 ng/ml, foram aplicadas

às placas conforme a seqüência: 100µl da primeira diluição contendo 5ng/ml de toxina , foram aplicados às colunas 1 e 2 em todas as fileiras, enquanto que a diluição contendo 10ng/ml, nas colunas 3 e 4, e em todas as fileiras, de maneira que todas as diferentes diluições do anticorpo de captura foram colocadas para reagir frente às diferentes concentrações do antígeno. Nas colunas 10 e 11 foram acrescentados 100 µl de PBS/T. Após incubação a 37°C por uma hora as placas foram lavadas de acordo com o procedimento já relatado.

O soro de cobaio anti EEB foi diluído a 1:500 e 1:1.000 em PBS/T e 100µl da primeira diluição foram aplicados às fileiras A, C, E e G enquanto as fileiras B, D, F e H receberam 100µl da segunda diluição. Incubou-se as placas a 37°C em câmara úmida por uma hora que em seguida foram lavadas conforme já descrito.

Foram adicionados 100µl do conjugado na diluição 1:20.000 em todas as cavidades, com exceção daquelas controle em que essa solução não se aplicava. Após esse período procedeu-se à lavagem com PBS/T por três vezes consecutivas. A reação foi revelada pela adição, em todas as cavidades, de 100µl de substrato, ou seja, tampão ácido cítrico fosfato 0,1M pH 5,6 contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD) e 0,5% de H₂O₂ (30 volumes).

Controles foram incluídos no ensaio, além dos já citados (conjugado e substrato), contendo:

IgG de coelho + soro de cobaia + conjugado + substrato

IgG de coelho + conjugado + substrato

EEB + soro de cobraia + conjugado + substrato

EEB + conjugado + substrato

Soro de cobraia + substrato

Conjugado + substrato

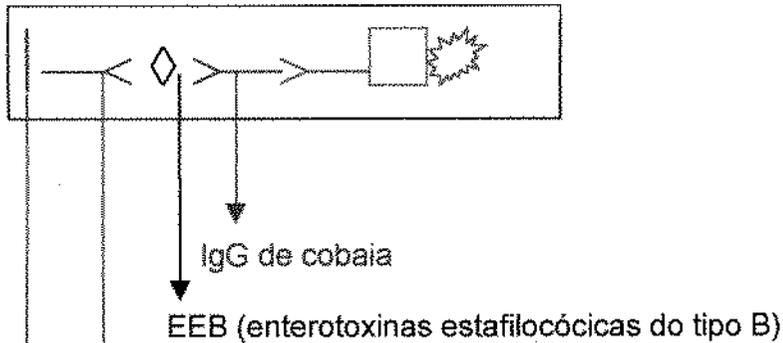
A placa foi mantida à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos, até o aparecimento da cor âmbar. Em seguida as reações foram interrompidas pela adição de 100 μ l de uma solução de H₂SO₄ 2 M.

A placa foi lida em espectrofotômetro Multiskan, a 492nm, tomando como branco da reação a leitura das colunas 11 e 12.

Para a determinação dos valores dos títulos da IgG de coelho e do anti-soro de cobraio foram considerados como positivos os valores de absorbância (D.O.) nas reações pelo menos 2 vezes maiores que o valor médio das D.O. dos controles negativos (sem antígeno), já descontados os valores de leitura das colunas 11 e 12, onde foram colocados os controles do substrato.

Os títulos de uso ficaram assim definidos: IgG de coelho ou anticorpo de captura na diluição 1:500, o que equivaleu a 6,5 μ g de proteínas por ml e o soro total de cobraio anti EEB na diluição 1:500.

V.2.3. Determinação da sensibilidade do ensaio "EIE" para detecção de enterotoxina B purificada de estafilococos.



- Suporte
- IgG de coelho
- EEB
- Soro de cobaia
- IgG de coelho anti-cobaia conjugado a peroxidase
- Substrato

Nessa etapa determinou-se a sensibilidade do teste de EIE para a detecção da enterotoxina estafilocócica do tipo B. Utilizou-se para tal o anticorpo de captura (IgG de coelho), o segundo anticorpo (soro de cobaia) e o conjugado (IgG de coelho anti-cobaia) previamente titulados e variou-se a concentração da toxina purificada.

O anticorpo de captura diluído a 1:500 contendo 6,5µg de proteínas por ml em tampão carbonato-bicarbonato com pH 9,6, foi aplicado a uma placa de poliestireno nas fileiras A, B, C, D, E e F nas colunas de 1 a 10. Em outra placa a mesma solução foi aplicada nas mesmas fileiras até a coluna 6. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas e, em seguida lavadas por três vezes com PBS/T.

Após a lavagem fez-se o bloqueio com o leite desnatado a 2%, sendo as placas incubadas a 37°C por 1 hora e lavadas com PBS/T.

A enterotoxina estafilocócica do tipo B diluída em PBS/T foi aplicada, nas concentrações de 1ng, 2ng, 5ng, 10ng, 20ng, 40ng, 100ng, e 200ng/ml. A diluição correspondente à concentração de 1ng de enterotoxina foi colocada nas colunas 1 e 2, fileiras A, B, C, D, e H. A solução contendo 2ng de EEB, às colunas 3 e 4, fileiras A, B, C, D e H e assim, até a última diluição. As outras cavidades receberam 100µl de PBS/T. Incubou-se por uma hora a 37°C e em seguida foi feita a lavagem por três vezes consecutivas com PBS/T.

Após essa etapa foi aplicado o soro total de cobaio diluído a 1:500, em todas as cavidades com exceção às colunas 11 e 12 e fileira F. As placas foram incubadas por uma hora a 37°C, e transcorrido esse tempo, foram lavadas consecutivamente com PBS/T, por três vezes

Foi acrescentado à reação o conjugado diluído a 1:20.000 em tampão carbonato-bicarbonato com pH 9,6, exceto às colunas 11 e 12, sendo as placas

então, incubadas durante 1 hora a 37°C, sendo após, lavadas com PBS/T por três vezes.

A reação foi revelada pela adição, em todos os orifícios, de 100µl de substrato ou seja, tampão ácido cítrico fosfato 0,1 M pH 5,6 contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD), e 0,5% de H₂O₂ (30 volumes). A placa foi mantida à temperatura ambiente até o aparecimento da cor âmbar, equivalendo a aproximadamente 10 minutos. Em seguida a reação foi bloqueada pela adição, em todas as cavidades, de 100µl de uma solução de H₂SO₄ a 2M. A leitura de D.O. foi realizada em espectrofotômetro Multiskan, a 492 nm.

Controles incluídos no ensaio:

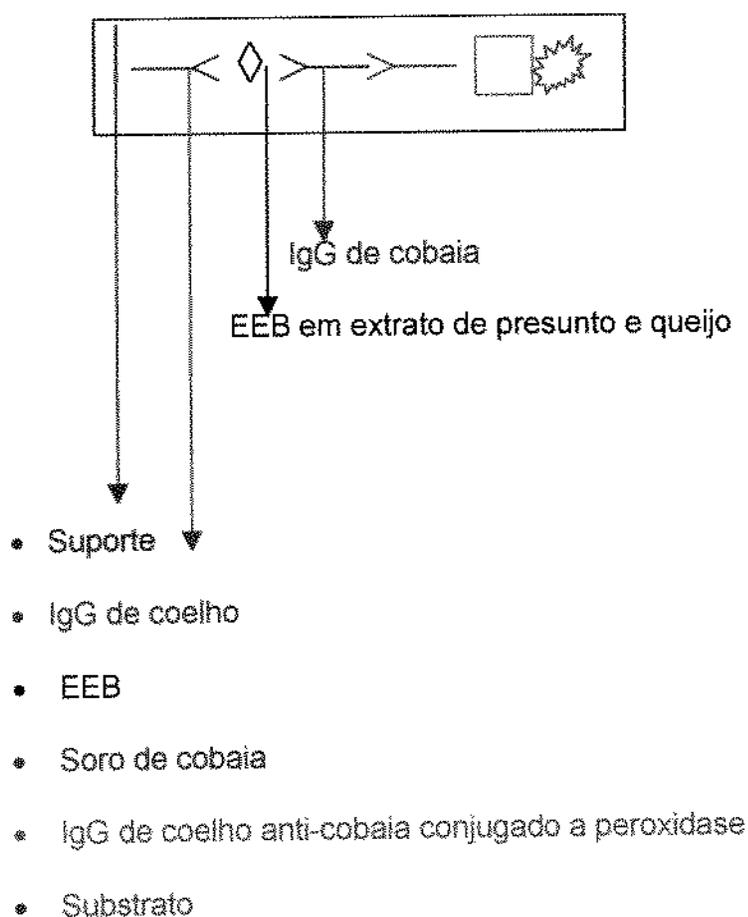
IgG de coelho + soro de cobaia + conjugado + substrato

IgG de coelho + conjugado + substrato

Soro de cobaia + conjugado + substrato

EEB (nas diferentes concentrações) + soro de cobaia + conjugado + substrato (H)

V.2.4. Determinação da sensibilidade do ensaio para a detecção da enterotoxina B de estafilococos em alimentos



Placas de poliestireno foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (IgG de coelho) na diluição 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato com pH 9,6, com exceção das colunas 11 e 12 e fileira D. As placas foram incubadas a

4°C por 18 horas e, após esse período, foram lavadas por três vezes consecutivas com tampão PBS/T.

Em seguida foi adicionado a solução bloqueadora contendo leite desnatado a 2% em PBS/T, em todas as cavidades das placas, que foram incubadas durante 1 hora a 37°C e lavadas por três vezes com tampão PBS/T.

Após o bloqueio, a enterotoxina estafilocócica B purificada foi diluída em PBS/T sob a forma de soluções contendo 2ng, 5ng, 10ng, 20ng e 40 ng. A solução contendo 2ng de EEB, foi aplicada às fileiras A e colunas 1 e 2, a diluição contendo 5ng foi aplicada às colunas 3 e 4, e assim sucessivamente distribuídas em duplicatas até as colunas 9 e 10 onde coube a solução contendo 40 ng.

Os alimentos escolhidos para teste foram o presunto e o queijo tipo Minas obtidos na rede comercial e, 10 g de cada amostra foram homogeneizados em 90 ml de PBS/T. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm e o sobrenadante com o pH 7,6 ajustado, foi separado em alíquotas de 5ml perfazendo um total de cinco amostras, onde foram inoculados diferentes concentrações de EEB (2ng, 5ng, 10ng, 20ng e 40ng).

Os extratos de presunto contendo as diferentes concentrações de EEB foram aplicados nas fileiras B e E seguindo o mesmo esquema da EEB purificada. Os extratos de queijo foram aplicados nas fileiras C e F, de acordo com o mesmo esquema. As fileiras D, E, F, e G foram utilizados para os controles das reações.

As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e posteriormente lavadas com PBS/T três vezes.

O segundo anticorpo (soro de cobaia) diluído a 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 foi aplicado em todas as cavidades das placas, exceto na coluna 11. Incubou-se por 1 hora a 37°C e em seguida lavou-se três vezes com tampão PBS/T.

Dando seqüência à reação, o conjugado (IgG de coelho anti-cobaia) diluído a 1:20.000 em PBS/T foi aplicado em todas as cavidades com exceção à coluna 11 e as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. Findo o tempo de incubação procedeu-se à lavagem das placas com PBS/T por três vezes. A reação foi revelada pela adição, em todas as cavidades, de 100µl de substrato ou seja, de tampão ácido cítrico fosfato 0,1 M pH 5,6 contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD) e 0,5% de H₂O₂ (30 volumes).

As placas foram mantidas à temperatura ambiente até o aparecimento da cor âmbar nas cavidades controle, equivalente a aproximadamente 10 minutos. Em seguida a reação foi bloqueada pela adição em todas as cavidades de 100 µl de uma solução de H₂SO₄ a 2M. A placa foi lida em espectrofotômetro Multiskan, a 492 nm, tomando como branco a coluna 11.

Controles incluídos no ensaio:

EEB purificada + soro de cobaia + conjugado + substrato

Extrato de presunto contendo EEB + soro de cobaia + conjugado +
substrato

Extrato de queijo contendo EEB + soro de cobaia + conjugado +
substrato

IgG de coelho + soro de cobaia + conjugado + substrato

A leitura correspondeu aos valores das D.O. lidas para controle da EEB
purificada, descontados os valores de D.O. de seus controles.

O teste foi considerado positivo para a detecção de EEB tomando as
leituras relativas aos testes com a EEB purificada como parâmetro.

VI – Resultados

VI.1. Produção e purificação da EEB

A concentração de proteínas totais no extrato inicial, foi de 23.760 mg sendo que 502,71 mg foi a fração correspondente a enterotoxina B. Após a cromatografia de troca iônica em Amberlite CG-50, houve a recuperação de 437,36 mg de enterotoxina B, equivalente a 87%. Esta fração submetida a uma segunda cromatografia em CM-Sepharose, resultou em 306 mg de enterotoxina cujo rendimento correspondeu a 60,87%. Na etapa final, após a exclusão molecular houve um rendimento de 50,12%, o que correspondeu a uma concentração final de toxina B equivalente a 252 mg. O rendimento global obtido no processo de purificação, foi de 50,12% superando os resultados obtidos por CHANG e BERGDOLL (1979) e UENO (1989).

Os resultados obtidos durante todo o processo de purificação, podem ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Quadro geral das etapas de purificação

Etapas	Volume (ml)	Proteína total(mg)	Enterotoxina B(mg)	Rendimento(%)
A	3600	23.760	502,71	100%
B	650	2165	437,36	87%
C	85	480	306	60,87%
D	20	273	252	50,12%
E				50,12%

A. Sobrenadante de cultura filtrado

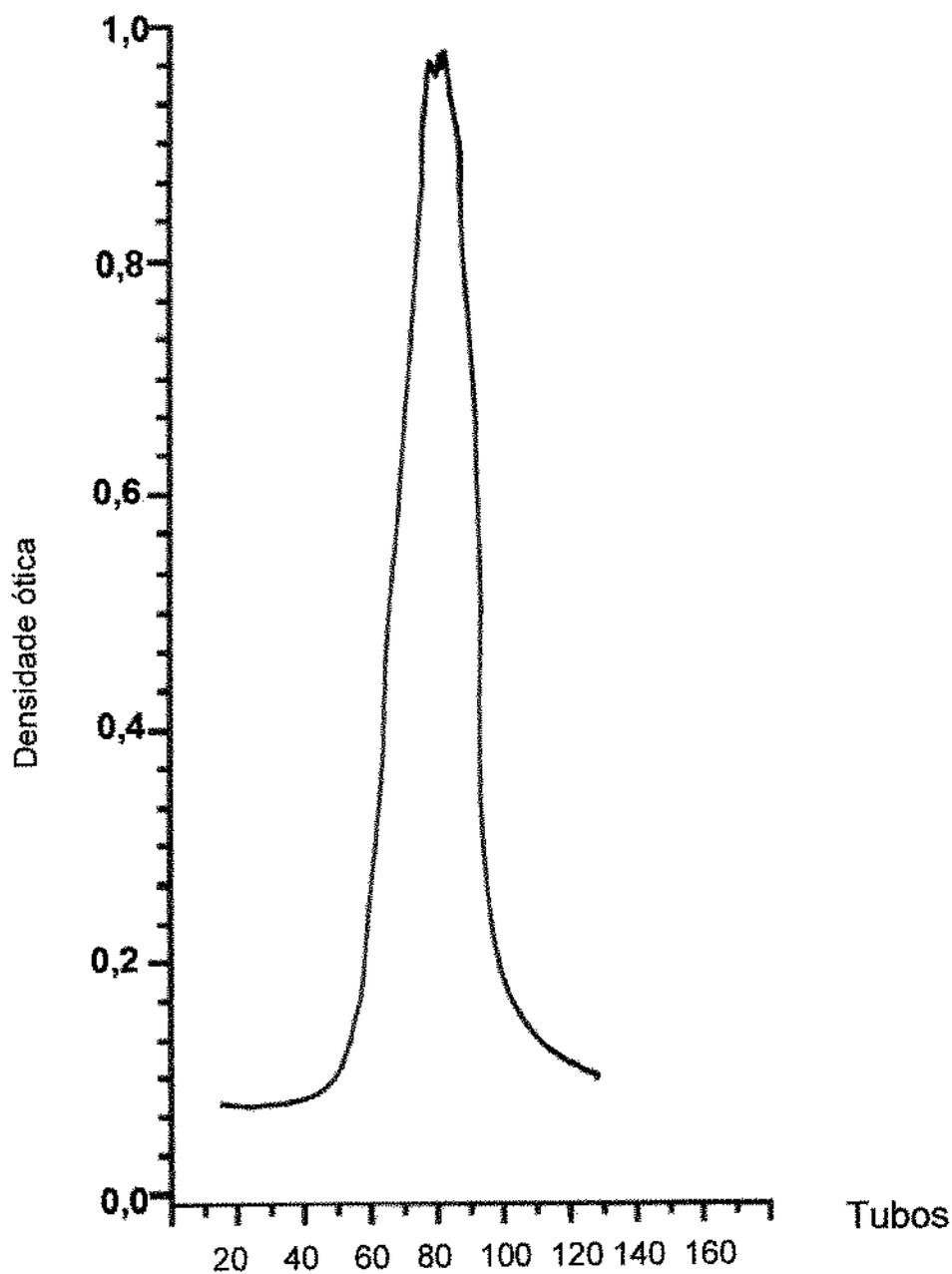
B. Valores de frações combinadas da cromatografia de troca iônica em Amberlite
CG 50

C. Valores de frações combinadas da cromatografia de troca iônica em CM -
Sepharose

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

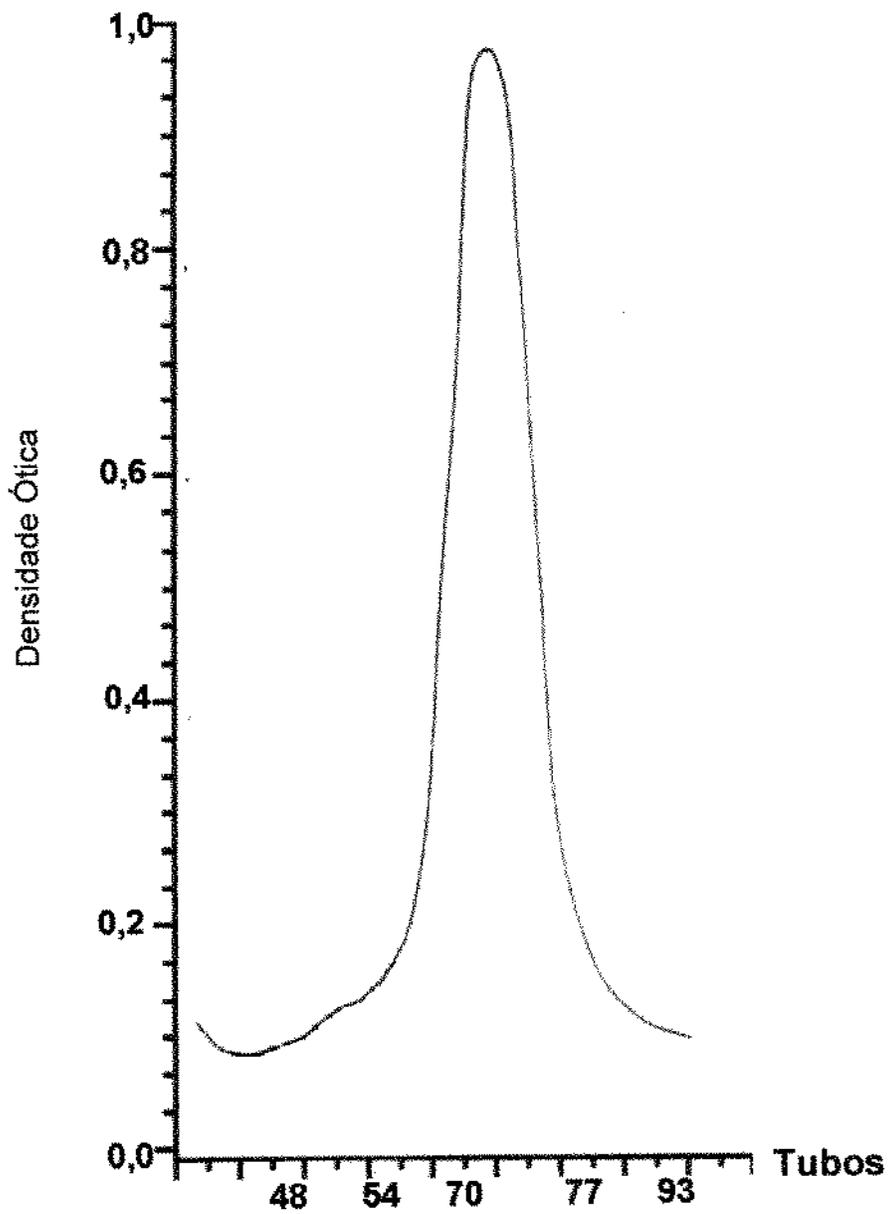
E. Rendimento global

Figura 1 - Cromatografia da enterotoxina B em CM - Sepharose, pH 6,0



Perfil da eluição da enterotoxina B em CM Sepharose. Amostra aplicada em tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 5,6 e eluída com 150 ml de tampão fosfato de sódio 0,03 M à pH 6,0 seguido de 400 ml de tampão fosfato de sódio 0,045 M à pH 6,2.

Figura 2 - Cromatografia de exclusão da enterotoxina B em coluna de Sephadex G 75.



Perfil da cromatografia de exclusão em Sephadex G75 com tampão fosfato de sódio 0,005M p H 6,8.

VI.2. Obtenção de soro anti EEB e determinação do título.

O esquema proposto para a imunização dos animais (vide quadro 1) provou ser eficiente haja visto a obtenção de um título igual a 1:32 em coelhos e cobaias.

Os soros obtidos demonstraram ser específicos para EEB, quando foi testada frente as outras enterotoxinas de estafilococos (A, B e D) conforme os resultados observados na reação de imunodifusão dupla em gel evidenciado pela precipitação de uma única nítida linha.

Quadro 1- Esquema de Imunização para Coelhos e Cobaias.

Imunização coelho	DIAS		
	1º dia	21º dia	42º-dia
Toxina (μg)	50	50	Sangria total
Título	-	-	1:32

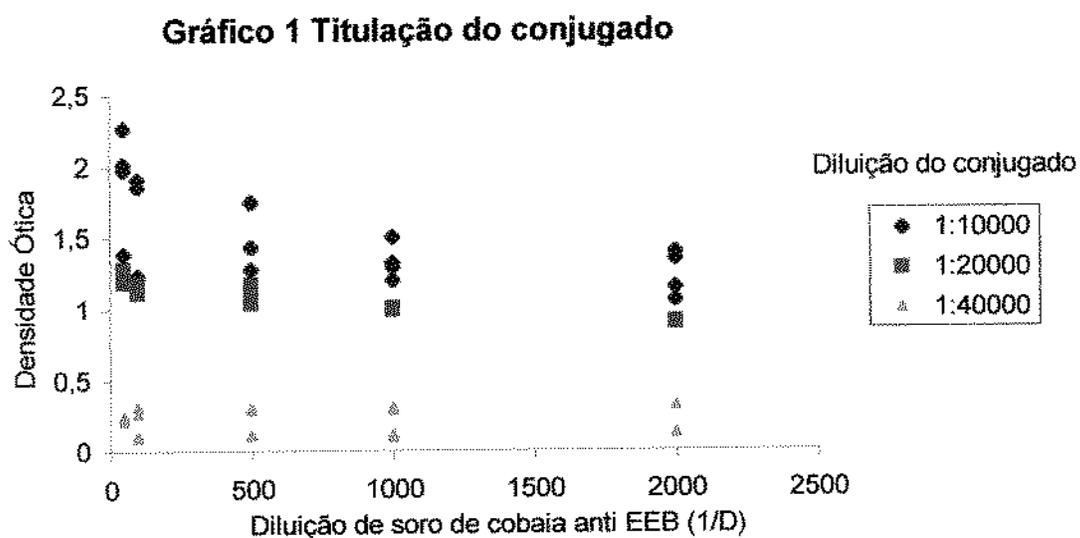
Imunização Cobaia	DIAS		
	1º dia	14ºdia	28º-dia
Toxina (μg)	50	50	Sangria total
Título	-	-	1:32

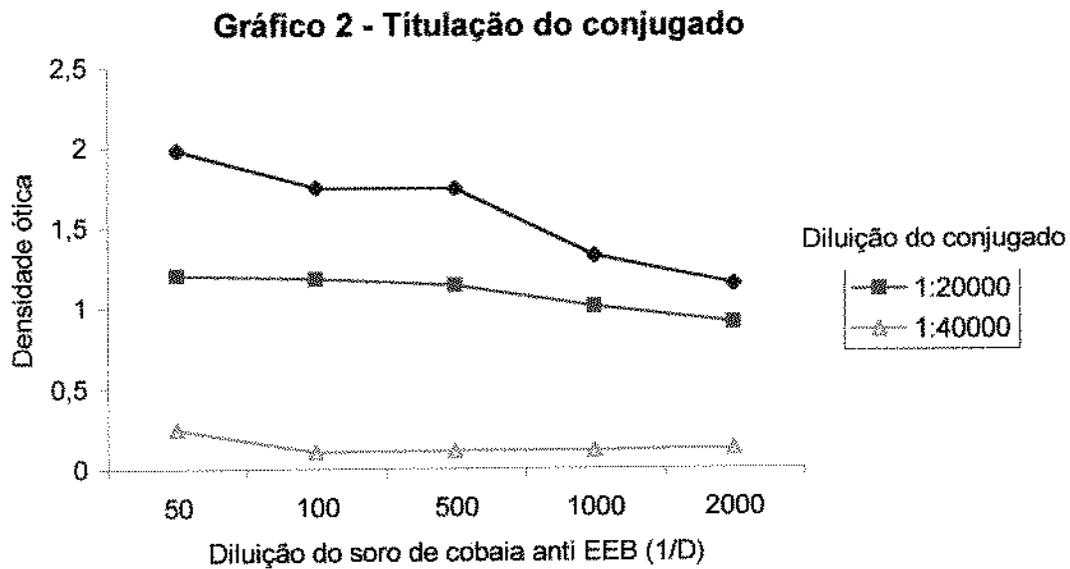
- não foi titulado

VI.3. - Determinação do título de uso do conjugado

A titulação do conjugado frente ao soro total de cobaia foi definida pela diluição 1:20.000, onde a leitura de densidade óptica (D.O.) foi maior ou igual a 0,200, valor referente a média das leituras da reação menos a leitura dos controles e do branco.

Todas as reações com o conjugado diluído a 1:40.000 deram leituras de densidade óptica menores que 0,200. Gráfico 1 e 2.





VI.4.- Determinação do título de uso do anti-soro de cobaias e anti-soro de coelhos, anti-enterotoxina B

O título de uso da IgG de coelho ou anticorpo de captura foi a diluição 1:500, cujo equivalente em proteínas totais foi igual a 6,5µg/ml. Para o soro de cobaia anti EEB ficou definido como sendo a diluição 1:500.

Para determinação desses títulos foram considerados como positivos os valores de absorbância (D.O.) nas reações, cujos resultados fossem

no mínimo duas vezes maiores que o valor médio das leituras dos controles negativos (sem antígeno) já descontados os valores referentes ao branco da reação. Gráfico 3 e 4.

Gráfico 3- Titulação da IgG de coelho x soro de cobaia 1:500

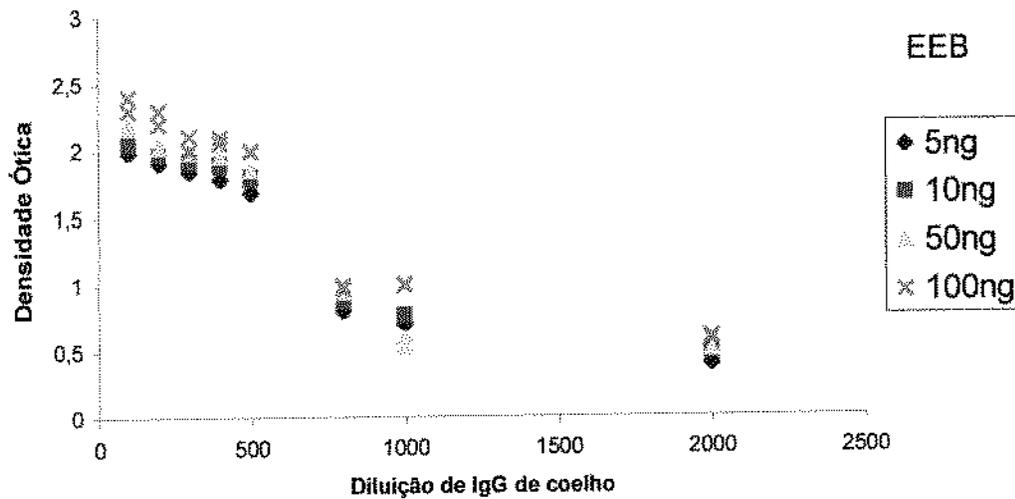


Gráfico 4 - Titulação de IgG de coelho x soro de cobaia (1:1000)

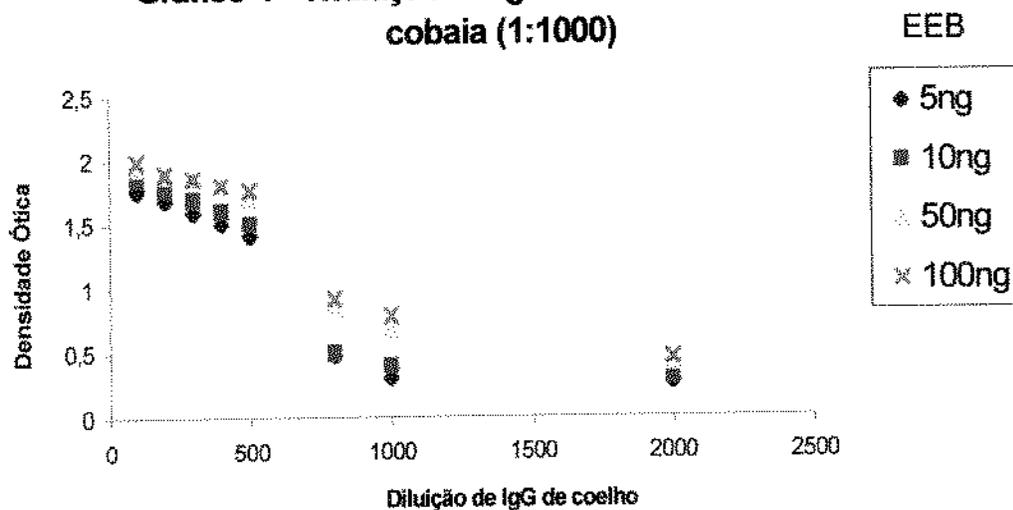
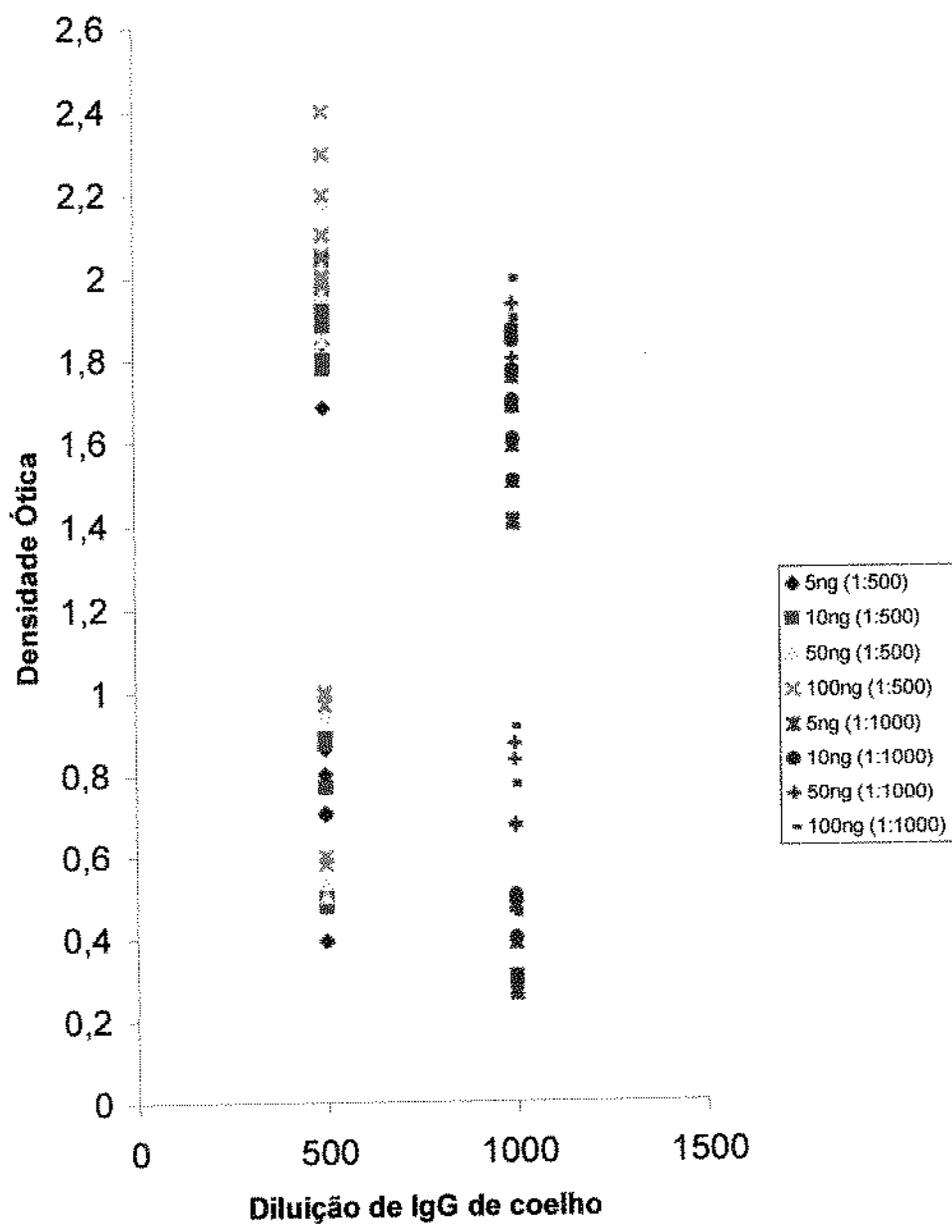


Gráfico 5 -Titulação de soro de cobaia x IgG de coelho



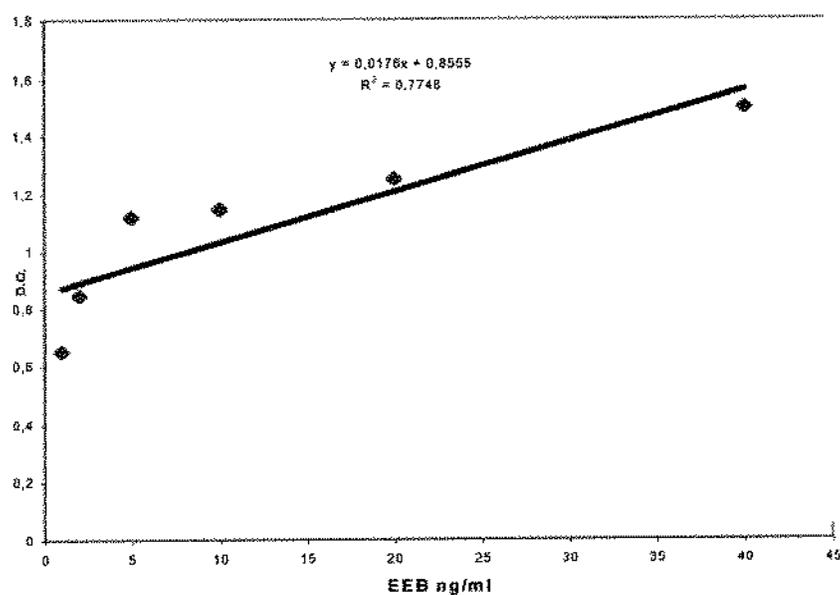
VI.5. Determinação da sensibilidade do E.I.E. para a detecção de enterotoxina estafilocócica do tipo B

A sensibilidade do ensaio foi para 1ng/ml de enterotoxina B pura em solução PBS/T, correspondendo as leituras em D.O. com valores iguais ou superiores a 0,600, considerados positivos, uma vez que todas as reações de controle do teste demonstraram valores específicos abaixo do mesmo. Gráfico 5.

Tabela 2 - Média das leituras em D.O. 492nm, para detecção de EEB em solução de PBS/T.

<i>EEB ng</i>	<i>D.O.</i>
1	0.651
2	0.846
5	1.119
10	1.145
20	1.249
40	1.497
100	1.682
200	2.176

Gráfico 5 - Curva padrão de enterotoxina estafilocócica do tipo B



VI.6. Determinação da sensibilidade do ensaio, para a detecção de enterotoxina B em alimentos.

O ensaio demonstrou ser sensível para detectar 0,9ng de EEB quando inoculada 10ng de enterotoxina em extrato de presunto, resultando em

9% de recuperação sobre o total e 2,4 ng em extrato de queijo quando inoculado com 20ng o que correspondeu a uma recuperação de 11,1%. Vide tabela 3.

Tabela-3 Determinação da sensibilidade do método na recuperação da EEB em extrato presunto e queijo

EEB (ng) pura inoculada em alimento	<i>Presunto</i>			<i>Queijo</i>		
	D.O.	EEB ng Recuperada	% Recuperada	D.O.	EEB ng Recuperada	% Recuperada
2	0,322	-105	-	0,295	-109	-
5	0,651	-53,8	-	0,635	-56,3	-
10	1,001	0,90	9	0,910	-13,3	-
20	1,011	2,47	12,35	1,010	2,3	11,5
40	1,155	24,9	62,25	1,110	17,9	44,75

Os valores das médias de D.O. obtidas por experimento, mais ou menos um desvio padrão descontados os valores dos controles do teste, divididos pelos valores das médias das leituras de cada um dos alimentos com valores maiores ou iguais a 1,0, foram considerados significantes (recuperação da enterotoxina).

VII. Discussão

Ainda hoje Órgãos Oficiais de Controle de Qualidade de Alimentos como o Instituto Adolfo Lutz "I. A .L" e o Laboratório de Bromatologia da Prefeitura Municipal de São Paulo utilizam como meio de triagem e classificação de Próprio ou Impróprio para consumo, o alimento que contenha contagem de *Staphylococcus aureus* conforme o número de colônias preconizados pela Portaria 411 de setembro 1997.

É sabido que, ações de controle de qualidade baseadas no diagnóstico do *Staphylococcus aureus* utilizando como método de identificação; morfologia das colônias, atividade de coagulase, Tnase, sensibilidade a lisostaphina e a utilização anaeróbia da glicose e manitol, não poderiam ser mais utilizadas por não existir uma correlação real com a enterotoxicidade (BENNETT e col. 1986).

Portanto, órgãos oficiais como a SEMAB - Secretaria Municipal do Abastecimento tem procurado junto as Universidades de renome como a UNICAMP, desenvolver métodos práticos de identificação de estafilococos enterotoxigênicos em alimentos.

No presente trabalho desenvolvido na FEA - Laboratório de Toxinas Microbianas, pudemos constatar que o ELISA duplo sanduíche foi eficiente na detecção de enterotoxinas em extrato de alimentos como queijo e presunto.

No processo de padronização do método de ELISA, a primeira etapa vencida foi a purificação da enterotoxina B, que seguiu a metodologia utilizada no Laboratório de Toxinas Microbianas da FEA de acordo com o protocolo elaborado em conjunto com o Prof. Dr. M. Bergdoll (FRI). A cultura semeada no meio com 3% de triptona e 1% de extrato de levedura foi adequada para o crescimento da cepa *Staphylococcus aureus* S6 utilizada para a produção de EEB. O aumento da velocidade de agitação (256 rpm) e tempo de incubação (48 horas) contribuíram para uma melhor produção e conseqüentemente um maior rendimento na etapa final de purificação de enterotoxina B, correspondendo a 50,12% de rendimento superando os resultados de 25% obtidos por CHANG (1979) e de 29% por UENO (1989).

Quanto ao processo de purificação da enterotoxina B, a utilização da resina CM-Sepharose possibilitou melhores resultados quando comparados aos dados obtidos por UENO (1989) que utilizou CM-celulose. Na segunda cromatografia de troca iônica acreditamos que as características da resina somado a um maior volume inicial de meio de cultura utilizado, foram os responsáveis pelo aumento do rendimento.

A imunização de coelhos e cobaias com a enterotoxina B purificada, apresentou no 42^a dia, um título igual a 1:32, o mesmo obtido por YOSHIMOTO (1994), quando utilizou o esquema proposto pelo Laboratório de Toxinas Microbianas para a obtenção de soro anti EED em coelhos. Em relação às cobaias, ficou patente a necessidade de ingestão de vitamina C como complemento alimentar, se ofertada a ração seca; suplementação esta desnecessária se a ração ofertada fosse a verde (capim navalha). O fato foi evidenciado pela morte dos dois primeiros animais imunizados durante o início do experimento.

Ao final da purificação obtivemos a enterotoxina estafilocócica B com um alto grau de pureza e especificidade, comprovada através da eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida que resultou em uma banda única e através da precipitação de uma única e nítida linha quando testada frente ao soro padrão específico na reação de imunodifusão dupla em gel de ágar noble. O mesmo foi observado nos trabalhos de CHU e col.(1966), UENO(1989) BRENM e col.(1990).

O método de ELISA "duplo sanduíche" foi escolhido por ser um método já reconhecido por sua sensibilidade e especificidade, fatos

comprovados nos trabalhos de BENNETT e col.(1976) que detectaram 5ng de enterotoxina em alimentos contaminados. Conforme resultados obtidos neste trabalho, foi detectada 1ng de EEB em extratos contendo enterotoxina pura e a recuperação de 0,9ng quando foi inoculada 10ng em extrato de presunto e 2,4ng em extrato de queijo quando inoculado 20ng. A diferença observada na recuperação dos dois alimentos, é explicada por SAUDERS e col.(1977) em trabalhos efetuados com a enterotoxina A, onde sugere que a ação de enzimas proteolíticas existentes em queijos interferem nas ligações do antisoro diminuindo a sensibilidade do método.

O método provou ser eficiente e prático para a triagem de amostras, pois o tempo máximo gasto entre o início e o final da reação correspondeu à 4 horas. Tempo este menor que o exigido por outras metodologias, e em concordância com BENNETT e col. (1976) que preconiza esta rotina em laboratórios de referência.

O presente trabalho permitiu concluir que o método do ELISA duplo sanduíche em placa possibilita a análise de muitas amostras ao mesmo tempo tornando o método econômico e de boa aplicabilidade. O volume de amostra de alimento utilizado é pequeno em relação ao ELISA em esferas e fitas de poliestireno, viabilizando a análise em casos de surtos onde freqüentemente a

amostragem é pequena. Por outro lado o risco de um falso negativo é maior, fato este observado por BERGDOLL (1991) que defende métodos que possibilitam a utilização de um volume maior de amostra.

A fim de se padronizar o ELISA “duplo sanduiche” foi feita a titulação em bloco da IgG de coelho anti-enterotoxina B utilizada como anticorpo de captura, cujo título foi igual a 1:500, o mesmo obtido para soro de cobaia o anticorpo detector. Esses resultados estão em conformidade com MORITA e col. (1978) e NICHAS e col.(1991) que desenvolveram o teste com o título do anticorpo de captura igual a 1:400.

O método de ELISA padronizado detectou em solução 1ng de EEB pura e recuperou 0,9ng quando foi inoculado 10 ng de enterotoxina em presunto e 2,4ng foi recuperado em queijo quando inoculado 20ng. Resultados semelhantes aos obtidos por FREED e col.(1982) e MORISSETTE e col. (1991) quando detectaram 1ng de enterotoxina por grama de alimento. LAPEYRE (1987) desenvolveu duplo sanduíche indireto detectando também 1ng por ml em extrato de cultura de enterotoxina B.

STIFFER-ROSENBERG e FEY 1978, pesquisaram a EEB em queijo e

detectaram 1ng quando inoculado 1 μ g, 0,5 μ g e 0,1 μ g em 20 ml de extrato de alimento. No presente trabalho foi possível detectar a melhor recuperação a um nível de inoculação de 10ng de EEB em presunto e a melhor recuperação equivalente a 20ng de EEB em extrato de queijo.

FREED e col., 1982, FEY e col., 1984, ENGVALL, e col. 1972, MORISSETTE e col., 1991 e outros sugerem como melhor método de avaliação o método de ELISA “duplo sanduíche” pois permite a detecção da enterotoxina em extrato de alimentos devido a grande sensibilidade e especificidade apresentada, mesmo na presença de um grande número de interferentes que fazem parte da sua composição.

VIII. CONCLUSÃO

- 1- A metodologia de purificação da enterotoxina estafilocócica B (EEB) empregando cromatografia de troca iônica em colunas de Amberlite CG-50 e CM-Sepharose e cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 mostrou-se mais eficiente comparada com metodologias descritas na literatura.
- 2- A EEB obtida demonstrou um alto grau de pureza quando testada frente ao soro padrão específico, resultado observado através de uma única linha nítida de precipitação e pela análise do perfil eletroforético observado pela formação de uma banda única.
- 3- A técnica do ELISA padronizado neste trabalho mostrou ser bastante sensível na detecção de EEB em solução contendo a toxina pura, detectando 1ng/ml.
- 4- O método foi capaz de detectar em extrato de presunto 0,9ng de EEB quando a concentração de enterotoxina inoculada foi de 10ng o que correspondeu a 9% de recuperação sobre o total inoculado e 2,4ng em extrato de queijo quando inoculado 20ng. Este fato torna evidente a necessidade do uso de métodos bastante sensíveis e específicos para a detecção de enterotoxina estafilocócica em alimentos
- 5- Estudos deveriam ser feitos quanto à especificidade do ensaio frente as outras enterotoxinas. Extratos de alimentos com diferentes conteúdos deveriam ser analisados a fim de se avaliar o grau de interferência dos seus componentes

em relação a detecção da EEB, e assim propor uma forma de tratamento dos extratos, antes de serem submetidas ao teste.

IX. Referências Bibliográficas

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Celular and Molecular Immunology*, Rio de Janeiro: **Revinter**, 1995, 440p.
2. ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R. Suitability of cynomologous (*Macaca fascicularis*) for staphylococcal enterotoxin bioassay. **Journal Food Safety**, Westport, v.3, p. 193-198, 1981.
3. ADESIYUN, A. A.; USMAN, B. Isolation of enterotoxigenic strains of staphylococci from dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.9, p. 459-468, 1983.
4. BAIRD-PARKER, A. C. An improved diagnostic and selective medium for isolation coagulase positive staphylococci. **Journal Applied Bacteriology**, v.25, p. 12-19, 1962.
5. BAIRD-PARKER, A. C. Methods for identifying staphylococci and micrococci. In: SKINNER, F. A., IOVELOCK, D.W.(ed) **Identification methods for microbiologists**. 2.ed., London: Academic Press Inc, 1979. p. 201-210.
6. BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: an introduction. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.19, p. 15- 85, 1990. {Symposium Supplement}

7. BARBER, L. E.; DEIBEL, R. H. Effect of and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. **Applied Microbiology**, Washington, v.24, p. 891 - 898, 1972.
8. BEAN, A. G. D.; FREIBERG, R. A.; ANDRADE, S.; MENON, S.; ZLOTNIK, A. Interleukin 10 protects mice against Staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, n.11, p. 4937-4939, 1993.
9. BENNETT, R. W.; McCLURE, F. Collaborative study of the serological identification of staphylococcal enterotoxins by the microslide gel double diffusion test. **Journal Association of Official Analytical Chemistry**, Arlington, v.59, n.3, p. 594-601, 1976.
10. BENNETT, R. W.; YETERION, M.; SMITH, W. et col. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. **Journal Food Science**, Chicago, v.51, p.1337-1339, 1986.
11. BENNETT, R. W.; McCLURE, F. Visual screening with enzyme immunossay for staphylococcal enterotoxins in foods: colaborative study. **Food Biological Contaminants**, v.77, n.2, p.357-364, 1994.

12. BERGDOLL, M. S.; SUGIYAMA, H.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin I Purification. **Archives Biochemistry Biophys**, New York, v.85, p. 62-69, 1959.
13. BERGDOLL, M. S.; SUGIYAMA, H., DACK, G. M. The recovery of staphylococcal enterotoxin from bacterial culture supernatantes by ion exchange. **Journal of Biochemistry and Microbiology Technology Engineering**, Westport, v.III, n.1, p.41- 50, 1961.
14. BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, M. R. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.90, p.1481-1485,1965.
15. BERGDOLL, M. S. The enterotoxins. In: Thomas, C. M.; Kadin, S., Ajil, S. J. **Microbiology Toxins**, New York: Academic Press, 1970. v.3, p. 265-327.
16. BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R. N., WEISS, K. F. Identification of enterotoxin E. **Infection and Immunity**, Washington , v.4, p. 593-595, 1971
17. BERGDOLL, M. S. The enterotoxins. In: Cohen, J. O. **The Staphylococci**.

New York: Wiley Interscience Publishers, 1972. p.187-331.

18. BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In : Riemann, H., Bryan, F. L. **Foodborne infection and intoxications**. 2 ed. New York: Academic Press, 1979. p. 443-494.
19. BERGDOLL, M. S. Enterotoxins. In Easman, C.F.S., Adlan, C. **Staphylococci and Staphylococcal Infections**. London: Academic Press, 1983. v.2, p.559-598.
20. BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p. 91-100, 1990
21. BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In CLIVER,D.O.(ed) **Foodborne diseases**. San Diego, Academic Press, 1990a. v.5, p.86-106.
22. BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. Presented at the workshop entitled "Old Friends and New Enemies" 104th. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, Arlington, v.74, p. 706-710, 1991.
23. BOHACH, G. A.; HANDLEY, J. P.; SCHLIERVERT, P. M. Biological and

- immunological properties of carboxyl terminus of staphylococcal enterotoxin C1. **Infection and Immunity**, Washington, v.57, p. 23-28, 1989.
24. BORJA, C. R.; FANNING, E.; HUANG, E.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.247, p. 2456-2463, 1972.
25. BOYLE, T.; LANCASTER, V.; HUNT, R.; GEMNSKI, P.; JETT, M. Method for simultaneous isolation and quantitation of platelet activating factor and multiple arachidinate metabolites from small samples; analysis of effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in mice. **Annals Biochemistry and Experimental Medicine**, Calcutta, v.216, p.373-382, 1994.
26. SÃO PAULO. **Código Sanitário. Decreto. NO 12342 de 27 de setembro 1978.**
27. BRASIL. **Portaria no 01, de 28 de janeiro de 1987**, Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária.
28. BRENN, R. D.; HOWARD, S. T.; HAMBLETON, P.; MELLING, J. Large-scale purification of staphylococcal enterotoxin A, B, and C2 by dye ligand affinity chromatography. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.56,

n.4, p. 1067-1072, 1990.

29. CASMAN, E. P.; BERGDOLL, M. S.; ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxins. **Journal Bacteriology**, Washington, v.85, p. 715-716, 1963.
30. CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W. Production of antiserum for staphylococcal enterotoxin. **Applied Microbiology**, Washington, v.12, p. 363- 367, 1964.
31. CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. **Applied Microbiology**, Washington, v. 13, p.181-189, 1965.
32. CHANG, P. C.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D . **Biochemistry**, New York, v.18, p.1937-1942, 1979.
33. CHAPES, S. K.; HOYNOWSKI, S. M.; WOODS, K. M.; ARMSTRONG, J. W. ; BEHARKA, A. A.; IANDOLO, J. J. Staphylococcal mediated T-Cell activation and spontaneous natural killer cell activity in the absence of major histocompatibility complex class II molecules., **Infection and Immunity**, Washington, v.61, n.9, p. 4013-4016, 1993.

34. CHU, S. F.; THADHANI, K.; SCHANTZ, E. J.; BERGDOLL, M. S. Purification and characterisation of staphylococcal enterotoxin A. **Biochemistry**, New York, v.5, p.3281-3289, 1966.
35. COLLINS, W. S.; METZGER, J. F.; JOHNSON, A. D. A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. **Journal Immunology**, Baltimore, v.108, p.852-856, 1973.
36. DACK, G. M. Food Poisoning. 2 ed. Chicago: University Press, 1949. Apud: BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococcal introduction. **Journal Applied Supplied**, Oxford, p. 1S-8S, 1990.
37. DACK, G. M. ; CARY, W. E.; WOOLPERT, O.; WIGGINS, H. J. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow haemolytic staphylococcus. *J.Prevent Medicine*, 4: 167-175, 1930. Apud : BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci an introduction. **Journal Applied Bacteriology Supplied**, Oxford, p.1S-8S, 1990.
38. DANIELSON, M. L., HELBERG, B. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing Staphylococci. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.18, p.266-273, 1977.

39. DAVIS, B. D.; DULBECO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; WOOD, W. D.; MCCART, M. Staphylococci in ; **Microbiology**. 8^a ed. New York: Hoeber Medical, 1970. p.727-740.
40. DEBRIESE, L. A. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.49, p.1-11, 1980.
41. DEUTERONOMIO. **Bíblia - Antigo Testamento**. Madri: Editora Católica, 1966. cap. 14, p. 176-177.
42. DUCAN, J. L.; CHO, G. J. Regulation of staphylococcal alpha toxin. II. Glucose repression of toxin formation. **Infection and Immunity**, Washington, v.6, p.689-694,1972.
43. EDWIN, C.; TATINI. S. R.; MAHESWARAN, S. K. Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxin B, C1, D and E. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.6, p.1253-1257,1986.
44. ENDE. I. A.; TERPLAN, G. KICKHOFEN; HAMMER, D. K. A. New method for purification of staphylococcal enterotoxin B and C. **Applied Environmental**

Microbiology, Washington, v.46, p.1323-1330, 1983.

45. ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.109, p. 129-135, 1972.
46. FEY, H.; STIFFLER-ROSENBERG, C.; WARTENWEILER-BURKHARD, G.; MULLER, C.; RUEGG, O. Der na hweiss von staphylokokken-enterotoxinen (set). **Schweizer Archiv fur Tierheilkund**, Bern, v.124, p. 297-306, 1982.
47. FEY, H.; PFIETER, H.; RUEGG, O. Comparative Evaluation of Different Enzyme-Linked Immnosorbent Assay Systems for the Detection of staphylococcal Enterotoxins A, B, C, and D. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.19, p.34-38, 1984.
48. FREED, R. C.; EVESON. M. L.; REIRER. R. F.; BERGDOLL. M. S.; Enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.1349-1355, 1982.
49. FUKUDA, S.; TOKUNO; H. O. et col. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart v.258, p.360-367, 1984.

50. GENIGEORGIS, C. A.; RIEMAN, H.; SADLER, W. W. Production of enterotoxin-B in cured meats. **Journal Food Science**, Chicago, v.34, p. 62-68, 1969.
51. GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **Food Microbiology**, London, v.9, p.327-360, 1989.
52. HEBERT, G. A.; PELHAM, P. L.; PITTMAN, B. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. **Applied Microbiology**, Washington, v.25, n.1, p. 26-36, 1973.
53. HUANG, I. Y.; CHANTZ, E. J.; BERDOLL, M. S. The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins. **Japanese Journal of Medical Science Biology**, Tokio, v.28, p. 73-75, 1976.
54. IGARASHI, H.; SHINGAKI, M.; BERGDOLL, M. S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.23, p.509-512, 1986.
55. JETT, M.; BRINKELEY, W.; NEILL, R.; GEMSKI, P.; HUNT, R. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge of monkeys; correlation of

plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. **Infection and Immunity**, Washington, v.58, p.3494-3499,1990.

56. JETT, M.; NEILL, R.; WELCH, C.; BOYLE, T.; BERTON, E. ;HOOVER, D.; LOWEL, G.; HUNT, R. E.; CHATTERJEE, S.; GEMSKI, P. Identification od staphylococcal enterotoxin B sequences important for induction od limphocyte proliferation by using sinthetic peptide fragments of the toxin. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, n.8, p. 3408-3415, 1994.
57. JOHNSON, H. M.; BUKOVIE, J. A.; KAUFFMAN, P. E.; PEELER , J. T. Staphylococcal enterotoxin B: Solid-phase radiomunoassay. **Applied Microbiology**, Washington, v.22, p. 837-841,1971.
58. JONES, D.; BOARD, R. G.; SUSSMAN, M. Staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, n.19, 1990. {Symposium series}
59. KELLER,G. M.; HANSON, R. S.; BERGDOLL, M. S. Effect of minerals on staphylococcal enterotoxin B production. **Infection Immunity**, Washington, v.20, p.158-160, 1978.
60. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S .D.; JANDA, W. M.; SCHRECKEN-BERGER, P.C.; WINN, Jr., W.C. Staphylococci and related organisms. **Diagnostic**

Microbiology. 4ed. 1992.

61. LAEMMLI, U. K., **Nature**, London, v. 227, p.680, 1970.
62. LAPEYRE, C., **Molecular Immunology**, Elmsford, v.24, p. 1243-1254, 1987.
63. LEE, A. C.; ROBBINS, R. N.; BERGDOLL, M. S. Isolation of specific and common antibodies to Staphylococcal enterotoxins B, C and C2. **Infection and Immunity**, Washington, v.27, p.431-434, 1980.
64. LEE, C. L. ; LIN, C. C. Detection of staphylococcal enterotoxin by latex agglutination inhibition test. **Microbiology Immunology**, Tokyo, v.17, p. 7-80, 1984.
65. LEVÍTICO. **Bíblia - Antigo Testamento**. Madri: Editora Católica, 1966.cap. 11, p. 99-100
66. LOHNEIS, M. ; JASCHKE, K. H.; TERPLAN, G. An immunoluminometric (ILMA) for the detection of staphylococcal enterotoxins. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v.5, p.117-127,1987.
67. LOTTER, L. P.; GENIGEORGIS, C. A. Desoxyribonucleic acid base

composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. **Applied Microbiology**, Washington, v.29, n.2, p.152-158, 1975.

68. LOTTER, L. P.; GENIGEORGES, C. A. Isolation of coagulase-negative enterotoxigenic staphylococci. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg. Abt.**, Stuttgart, v.239, p.18-30, 1977. {I. Orig. Reihe A.}
69. LOWRY, O. W.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
70. MELCONIAN, A. K.; FLANDROIS, F. P.; FLEURETTE, J. Modified method for production and purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.45, p.1140-1143, 1983.
71. METZGER, J. F.; JOHNSON, A. D.; COLLINS, W. S. Fractionation and purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B by electrofocusing. **Archives Biochemistry Biophys**, New York, v.257, p.183-186, 1972.
72. McLEAN, R. A.; LILLY, H. D. A.; ALFORD, J. A. Effects of meat-curing salts and temperature on production of *Staphylococcus* enterotoxin B. **Journal of**

- Bacteriology**, Washington, v.95, p.1207 - 1211, 1968.
73. MORISSETTE, C.; GOULET, J.; LAMOUREX, G. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.3, p.835-842, 1991.
74. MORITA, T. N.; WOODBURN, M. J. Homogeneous Enzyme Immune Assay for Staphylococcal Enterotoxin B. **Infection Immunity**, Washington, v.21, n.2, p.666-668, 1978.
75. NYCHAS, G. J.; TRANTER, H. S.; BREHM, R. D.; BOARD, R. G. *Staphylococcus aureus* S -6 : factors affecting its growth, enterotoxin B production and exoprotein formation. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, p.344-350, 1991.
76. NUNHEIMER, T. D.; FABIAN, F. W. Influence of organic acids, sugars and sodiun chloride upon strains of food poisoning staphylococcal. **American Journal Public Health**, Washington, v.30, p.1040-1049, 1940.
77. OGSTON, A. Report upon microrganismos in surgical diseases, **British Medical Journal**, Edinburgh, v.1, p.369-375, 1882.

78. OUCHTERLONY, O. Antigen antibody reactions in gels. **Acta Pathologic Microbiology Scandinavica**, Kobenhavn, v.25, p.507-515, 1949.
79. PARK, C. E.; MELO, A. S.; LANDGRAF, M. et col. A survey of microorganisms for termonuclease production. **Canadian Journal Microbiology Scandinavica**, Ottawa, v.32, p.532-535, 1980.
80. PARK, C. E.; SZABO, R. Evaluation of reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D in foods. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.32, p.723-727, 1986.
81. PARSONNET, L. Mediators in the pathogenesis. Mediators in the pathogenesis of toxic shock syndrome: overview. **Review Infectology Disease**, Chicago, v.11, p. S 263, 1989.
82. PELCZAR, Jr .M. J. ; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. Microbiology "Concepts and Applications" MCGRAW-HILL, INC. 1993.
83. PEREIRA, J. L.; SALSBERG, S. P.; BERGDOLL, M. S. Effect of temperature pH and sodium chloride concentrations of productions of staphylococcal enterotoxins A and B. **Journal Food Protection**, Ames, v.45, p.1306-

1309,1982.

84. PONTZER, C. K.; RUSSEL, J. K.; JHONSON, H. M. Localization of an immune functional site on staphylococcal enterotoxin A using their synthetic peptide approach. **Journal Immunology**, Batimore, v.143, p. 280-284,1989.
85. READ, R. B.; BRADSHAW, J. G. Irradiation of staphylococcal enterotoxin B . **Journal Applied Microbiology**, Washington,v.15, p. 603-605, 1967.
86. REYNOLDS, D.; TRANTER, H.S.; SAGE, R.; HAMBLETON, P. Novel method for purification of staphylococcal enterotoxin A. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1761 - 1765, 1988.
87. ROBBINS, R. S.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**, Washington, v.28, p.946-950.1974.
88. ROBERN, H.; STAVIC, S.; DICKIE, N. Fractionation of staphylococcal enterotoxin A by isoelectric focusing. **Experientia**, Basel, v.30, p.1087-1089, 1974.
89. ROBERN, H.; STAVIC, S.; DICKIE, N. The application of QAE-Sephadex for the

purification of two staphylococcal enterotoxins. II Purification of enterotoxin A. **Archives Biochemistry Biophys**, New York, v.393, p.159-164, 1975.

90. ROSENBACH, F.J. Mikroorganismen bei den wundinfektionskrankheiten des Menschen. Bergman, J. F. Wiesbaden, Germany. Apud Bergdoll, M.S. *Staphylococcus aureus*. in Doyle, M. P. (ed) **Foodborne bacteriology pathogens**, New York, p.463-523, 1989.
91. SAUNDERS, G. C.; BARTLETT, M. L. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of Staphylococcal enterotoxin A. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.34, p.518 - 522 , 1977.
92. SCHANTZ , E. J.; ROESSIER , W. G.; WAGMAN, J.; SPERO, L.; DUNNERY, D. A.; BERGDOLL, M. S. Purification of Staphylococcal enterotoxin B. **Biochemistry**, New York, v.4, p.1011-1016, 1965.
93. SCHLEIFER, K. H. Micrococcaceae. In: SNEATH, P. H. A. , MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. and HOLT, J. G.(eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v.2.
94. SCHMIDT, J. J.; SPERO, L. The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C, **Journal Biological Chemistry**, Bethesda,

v.258, p.6300-6306, 1983.

95. SCHWABE, M.; NOTERMANS, S.; BOOT, R.; TATINI, S. R.; KRAMER, J. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.33-42, 1990.
96. SCHLEIFER, K. H.; KROPPESTEDT, R. M. Chemical and molecular classification of staphylococci. **Journal Applied Bacteriology**, New York, v.19, p.9S-24S, 1990.{Symposium Supplement}
97. SCOTT, W. J. Water relation *Staphylococcus aureus* at 300C. Aust. **Pavlovian Journal Biological Science**, Philadelphia, v.6, p.544-563, 1953.
98. SILVERMAN, S. J.; KNOTT, A. R.; HOWARD, A. Rapid sensitive assay for staphylococcal enterotoxins and a comparison of serological methods. **Applied Microbiology**, Washington, v.16, p.1019-1023, 1968.
99. SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARP, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**.1st ed. Baltimore: William & Wilkins, 1986. v.2, p. 999-1035.

100. SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of coagulase tests for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, Washington, v.24, n.2, p. 183-191, 1980.
101. SPERO, L.; STEFANYE, D.; BRECHER, P. I.; JACOBY, H. M.; DALIDOWICZ, J. E.; SCHANTZ, E. J. Amino Acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin B. **Biochemistry**, New York, v.4, p.1024-1030, 1965.
102. SPERO, L.; MORLOCK, B. A. Biological activities of the peptides of staphylococcal enterotoxin C formed by limited tryptic hydrolysis. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v.253, p.8787-8791, 1978.
103. SPERO, L.; MORLOCK, B. A. Cross-reaction between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxin B and C1. **Journal Immunology**, Baltimore, v.122, n.4, p. 1285-1289, 1979.
104. SPERO, L.; MORLOCK, B. A. (1979) apud BERGDOLL, M. S.- Enterotoxins. In : C.F.S. Easman and ADLAM C. **Staphylococci and Staphylococcal Infections**. London: Academic Press, 1983, v.2, p.559 -598.
105. STIFFLER-ROSEMBERG, G.; FEY, H. Simple Assay for Staphylococcal

Enterotoxins A, B, e C : Modification of Enzyme Linked Immunosorbent Assay. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.8, n.5, p. 473 - 479, 1978.

106. STRICKLER, M. P. NEILL, R. J.; STONE, M. J.; HUNT, R. E.; BRINKLEY, W.; GEMSKI, P. Rapid purification of Staphylococcal enterotoxin B by high-pressure liquid chromatography. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n.5, p. 1031-1035, 1989.

107. SURGALA, M. J.; KADAVY, J. D.; BERGDOLL, M. S.; DACK, G.M. Staphylococcal Enterotoxin : Production methods. **Journal Infection Diseases**, Cambridge, v.89, p.180-184, 1951.

108. TATINI, S. R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal Milk Technology**, Oranje, v.36, n.11, p.559-563, 1973.

109. TATINI, S. R.; SOO, H. M.; CORDS, B. R. Heat-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence enterotoxins in foods. **Journal Food Science**, Chicago, p. 352-356, 1975.

110. TATINI, S. R.; CORDS, B. R.; GRAMOLLL, J. Screening for staphylococcal

enterotoxins in food . **Food Technology**, Chicago, v.30, p. 64-74,1976.

111. TROLLER, J. A. Effect of water activity on enterotoxin B production and grown of *Staphylococcus aureus* **Applied Microbiology**, Washington, v.21, p.425-439, 1971.

112. TRANTER, H. S. Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, London, v.27, p.1044-1046, 1990.

113. UENO, M. **Purificação de Enterotoxina B**. Campinas, 1989. Tese (Mestre em tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP-SP.

114. VANDERBOSCH, C. L. L.; FUNG, D. Y. C.; WIDOMSKI, M. Optimum temperature for enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* S6 and 137 in liquid medium. **Applied Microbiology**, Washington, v.25, n.3, p. 498-500, 1973.

115. VARADARAJ, M. C.; RANGANATHAN, B. Staphylococcal enterotoxin methods of production and detection - a Indian. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.42, n.2, p.267-272, 1989.

116. YOSHIMOTO, Y. **Enterotoxina estafilocócica tipo D: Purificação e obtenção de antissoro**. Campinas: 1994.127p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP-SP.
117. WADSWORTH, D. A. Slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel. **Internation Archives Allergy Applied Immnology**, Basel, v. 10, p.355-360, 1957.
118. WILLIAMS, R. R.; WEHR, C. T.; ROGERS, T.J.; BENNETT, R.W. High performance liquid chromatography of staphylococcal enterotoxin B. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v.266, p.179 - 186, 1983.