

ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA: AVANÇOS METODOLÓGICOS NA DETECÇÃO EM ALIMENTOS

ELISA YOKO HIROOKA¹
FRANCISCO HERRERO²

HIROOKA, E. Y. HERRERO, F. Enterotoxina estafilocócica: avanços metodológicos na detecção em alimentos
Semina: Ci. Agr., Londrina, v.14, n.1, p.32-35, mar. 1993.

RESUMO: Métodos visando detecção de enterotoxina estafilocócica tem recebido constante atenção e modificação, com a finalidade de acelerar diagnóstico numa intoxicação alimentar. A revisão expõe a situação atual e as perspectivas sobre o desenvolvimento e aplicação de métodos rápidos com elevada sensibilidade, para o controle de qualidade nos alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Enterotoxina, estafilococo, métodos.

A versatilidade nutricional de estafilococos resulta nas mais variadas doenças humanas e animais, desde síndromes mediadas por toxinas e infecções contíguas ou metastáticas (ARBUTHNOTT et al. 1990). Entre os metabólitos de estafilococos patogênicos, a enterotoxina desempenha papel crucial na intoxicação alimentar, cuja doença é caracterizada pelos sintomas gastrointestinais de aparecimento rápido e fugaz (BERGDOLL, 1970; MINOR & MARTH 1976; BERGDOLL, 1983).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas simples com PM de 26.000 a 29.000 Da, ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, apresentando duas cisteínas formando ponte de dissulfeto (BERGDOLL et al. 1981). A sua estrutura bastante compacta e não hidratada confere estabilidade sob extensa variação físico-química, salientando-se a termorresistência como característica principal (MINOR & MARTH, 1976; NISKANEN, 1977; HERTEN et al. 1989). Além da persistência de integridade em alta temperatura, não são destruídos pelos processos normais de cura, fermentação e armazenagem que inviabilizam o estafilococo (MINOR & MARTH, 1972; HERTEN et al. 1989).

Considerando que as enterotoxinas são proteínas simples, os métodos químicos são incapazes de detectá-las, e por esta razão, somente os métodos biológicos e imunológicos são utilizados (BERGDOLL, 1970).

O ensaio biológico, devido à incapacidade de diferenciar as toxinas e ainda pela dificuldade de manutenção dos animais, é utilizado somente para detectar a existência de novas enterotoxinas (BERGDOLL, 1970; MINOR & MARTH, 1976).

Entre as várias técnicas de reações imunológicas, preliminarmente desenvolveu-se técnica de precipitação

em ágar ou agarose (BERGDOLL, 1970; HUMPHREY & WHITE 1971; BARRY et al. 1973), aplicando a difusão simples unidimensional (OUDIN, 1952), difusão dupla (ROBBINS et al. 1974, BENNETT 1971), técnica da micro-lâmina (ZEHREN & ZEHREN, 1968, CASMAN et al. 1969) e difusão em tubo capilar (FUNG & WAGNER, 1971). Estes métodos apresentam sensibilidade suficiente para detectar as enterotoxinas em extrato de cultura, recomendando-se a imunodifusão dupla — OSP de ROBBINS et al. (1974), com limite de detecção de 0,5 µg/ml.

Linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicas produzem toxinas em torno de 1ng/ml ou menos em alimentos (KOKKAN & BERGDOLL, 1987; EVENSON et al. 1988), estando, portanto, abaixo dos níveis detectáveis pelos métodos anteriormente citados.

A enterotoxina, mais comumente associada a intoxicação alimentar é normalmente encontrada em concentração inferior a 1µg/100g de alimento (REISER et al. 1974).

Considerando a diluição devida a preparação de extrato, torna-se evidente que o teste deve ser sensível a nível de 0,5 a 1,0ng/ml, apresentar procedimento simples e rápido, e ser aplicado diretamente em extrato alimentar (SAUNDERS & BARTLETT, 1977; FREED et al. 1982; FEY et al. 1984; MORGAN & LEE, 1990).

Neste sentido, vem-se desenvolvendo as técnicas de hemaglutinação passiva reversa-RPHA, aglutinação de látex-RPLA, radioimunoensaio-RIA e ensaio imunoenzimático-ELISA, apresentando sensibilidade entre 0.1 a 1,5 ng/ml.

Aglutinação reversa passiva de SILVERMAN et al, 1968; surgiu como primeiro método promissor para detecção

1 Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA — Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina - Paraná - Brasil.
2 Departamento de Análises Clínicas/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde — Universidade Estadual de Maringá.

rápida de enterotoxina. Entretanto, os dois principais problemas estão na impossibilidade de acoplar certos anticorpos à superfície do eritrócito e, à ocorrência de aglutinação inespecífica, causada pelos componentes alimentares, particularmente o extrato de carne (BERGDOLL & BENNETT, 1976).

O radioimunoensaio (JOHNSON et al, 1973, ORTH, 1977; LINDROTH & NISKANEN, 1977; ROBERN et al, 1978; ARESON et al, 1980, BERGDOLL et al, 1985), apesar de sensibilidade de 1 a 5ng/ml e alta especificidade tem como restrição a utilização de marcador radioativo (BENNETT, 1971; JOHNSON et al, 1971; THOMPSON et al. 1986).

A substituição de marcador radioativo pela enzima elimina completamente o risco de contaminação e, atualmente, o ensaio imunoenzimático consiste em método de escolha para a detecção direta de enterotoxina em alimentos (JOHNSON et al, 1971).

Vários métodos de ELISA foram introduzidos, utilizando conjugados de fosfatase ou peroxidase com anticorpo ou toxina (FREED et al, 1982; FEY et al. 1984; THOMPSON et al, 1986).

O método de "Sandwich" com anticorpos marcados, tem apresentado maior reprodutibilidade, atingindo limite de detecção da ordem de 0,1ng/ml de enterotoxina (FEY et al, 1984).

Recentemente, PARK & AZABO (1986) e IGARASHI et al. (1986), melhoraram o teste de aglutinação passiva reversa, substituindo hemácias pelo látex, introduzindo o método de RPLA. O RPLA elimina o problema com adsorção de anticorpos e aumenta a sensibilidade para 0,75ng/ml e comparado ao método de ELISA, apresenta vantagem quanto a simplicidade na execução do teste, rapidez, menor complexibilidade e maior estabilidade dos reagentes. Entretanto, reação inespecífica com determinados componentes alimentares restringe o seu uso (SAUNDERS & BARTICTI, 1977; FREED et al, 1982; FEY et al. 1984; MORGAN & LEE, 1990).

Já é de conhecimento que estafilococos produzem enterotoxinas EEA a EEE e Toxina TSST-1, proteínas apresentando uma estrutura química semelhante e que para cada toxina existe o antisoro específico (BERGDOLL et al, 1971; LEE & BERGDOLL, 1983). Aliado a esse fato, as enterotoxinas atuam como superantígenos, ligando-se a proteínas de classe II de histocompatibilidade MHC, ativando células T que expressam produto gênico TCRVb, produtores de anticorpos (DOLSTEN et al, 1991).

Para o laboratório de controle de qualidade, esta alta especificidade do antisoro torna a análise de enterotoxina onerosa já que se deve dispor de todos os antisoros. Em termos práticos, seria ideal que existisse uma imunoglobulina capaz de detectar os mesmos epitopos em todas as enterotoxinas, independentemente de variações estruturais, uma vez que estas desencadeiam intoxicação ali-

mentar com as mesmas características sintomatológicas (SUGIYAMA et al, 1960; BANNY et al, 1984; MEYER et al. 1984).

Uma opção seria o "Dip Stich Test", um ensaio imunoenzimático que contém os reagentes necessários para a detecção de todas as enterotoxinas (MORGAN & LEE, 1990, MORISSETTE et al. 1991). Entretanto, uma solução mais simples e racional seria a utilização de um anticorpo monoclonal, capaz de reagir com diferentes enterotoxinas (MEYER et al. 1984; EDWIN et al. 1984), baseado no princípio de que existe um sítio tóxico na molécula, comum às enterotoxinas (SINGH et al. 1988; IANDOLO, 1989).

THOMPSON et al. (1984; 1986) e MEYER et al. (1984) realizaram trabalhos com anticorpos monoclonais e obtiveram clones capazes de reagir com mais de uma enterotoxina, porém os resultados obtidos ainda estão longe da meta final, ou seja, a reatividade total com diferentes enterotoxinas.

Apesar de avanços atingidos nestes últimos anos, deve-se salientar que, estes métodos são adequados para detectar enterotoxinas em alimentos envolvidos em intoxicação, mas ainda questionáveis quanto a utilização em determinação de contaminação estafilocócica a nível de controle de qualidade (informação pessoal, Dr. Bergdoll).

Perspectiva promissora, emergente na atualidade é a introdução de substratos fluorogênicos e marcadores bioluminescentes em imunoenaios (SWAMINATHAN & KONGER, 1986; MORGAN & LEE, 1990). Os substratos fluorogênicos tem conseguido aceitabilidade cada vez maior e o 4-metil umbeliferil fosfato aumenta a sensibilidade de detecção de *H. influenzae* em 64 vezes, em relação ao método colorimétrico (YOLKEN & LEISTER, 1982). Considerando a otimização de ensaio, a sensibilidade poderá atingir 3 a 10 attos, ou seja, 10^{-18} g/ml de toxina (SWAMINATHAN & KONGER, 1986). Uma outra alternativa seria aproveitar a afinidade excepcionalmente elevada de avidina à biotina, em métodos imunológicos (THERASSE et al., 1990; MORISSETTE et al. 1991).

Progressos em tecnologia de DNA recombinante oferecem a possibilidade de sintetizar nucleotídeos sondas capazes de detectar diretamente o gen tox no microrganismo contaminante, permitindo aplicação a nível de controle de qualidade (TRANter & BREHM, 1990). Além deste fator, existe possibilidade de obter uma sonda reativa com todas as enterotoxinas, se considerarmos um sítio comum (BETLEY et al. 1986; BETLEY & MEKALANOS 1988, IANDOLO, 1989).

Tendo em vista que a elevada resistência físico-química faz com que enterotoxinas permaneçam nos alimentos, cuja contaminação estafilocócica é nula, o desenvolvimento de ambas as técnicas, a de imunensaio e de DNA recombinante é importante para o laboratório de controle de qualidade.

HIROOKA, E.Y., HERRERO, F. Staphylococcal enterotoxin: advances in the detection methods in foods. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.14, n.1, p.32-35, Mar. 1993.

ABSTRACT: *Methods for staphylococcal enterotoxin detection have received constant attention and modification, with the intention of accelerating the food intoxication diagnosis. This study shows the actual situation and the perspectives about the development and application of rapid methods with high sensitivity, for the quality control in the food.*

KEY-WORDS: *Enterotoxin, staphylococci, methods.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; AZAVEBO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. Apud JONES, D.P.; BOARD, K.G., SUSSUMAN, M. *Staphylococci J. Appl. Bacteriol. Symp. Oxford*, n. 19, p.101-107, 1990.
- ARESON, O.D.W.; CHARM, S.E.; WONG, B.L. Determination of Staphylococcal enterotoxins A and B in various food extracts using Staphylococcal cell containing protein A. *J. Food Sci.*, v.45, p.400-401, 1980.
- BARRY, A.J.; LACHICA, R.V.F.; ATCHINSON, F.W. Identification of *S. aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease test. *Appl. Microbiol.*, v.25, p.486-487, 1973.
- BARRY, J.T.; TAYLOR, S.L.; FREED, R.C.; BERGDOLL, M.S. Effects of staphylococcal enterotoxin A on the rat gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, v.44, p.234-240, 1984.
- BENNETT, R.W. Microbiological methods. *J. Adac.*, v.54, p.1037-1038, 1971.
- BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In EASMAN, C.F.S.; ADIAM, C. *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academic Press, 1983. p.559-598.
- Enterotoxins. In: MONTIE, T.C.; KADIS, S.; AJL, S. *J. Microbial Toxins*. New York: Academic Press, 1970. v.3, p.236-265.
- BERGDOLL, M.S.; BENNETT, R.V. Staphylococcal enterotoxin. In: COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. Washington: Marvin L. Speck, 1976, p.387-416.
- BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N.; WEISS, K.F. Identification of enterotoxin. *E. Infect. Immun.*, v.4, p.593-595, 1971.
- BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; DAVIS, J.P. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome. *Staphylococcus aureus* isolated. *Lancet*, v.1, n.3, p.1017-1021, 1981.
- BERGDOLL, M.S.; REISER, R.N.; CRASS, B.A., ROBBINS, R.N. THOMPSON, N.E. Toxic shock syndrome-the role of the toxin. *Postgrad. Med. J.*, v.61, p.35-38, 1985.
- BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, v.70, p. 34-41, 1988.
- BETLEY, M.J.; MILLER, V.L.; MEKALANOS, J.J. Genetics of bacterial enterotoxins. *Ann. Rev. Microbiol.* v.40, p.557-605, 1986.
- CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E.; STONE, J.E. The microslide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.*, v.6, p.185-197, 1969.
- DOHLSTEN, M., HELDLUND, G.; KALLAND, T. Staphylococcal enterotoxin dependent cell mediated cytotoxicity. *Immunol. Today*. v.12, p.147-150, 1991.
- EDWIN, C.; TATINI, D.R.; STROBEL, R.S., MAHESWARAN, S.R. Production of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p.1171-1175, 1984.
- EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* v.7, p.311-316, 1988.
- FEY, H., PFISTER, H.; RIUEGG, O. Comparative evaluation of different enzyme linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J. Clin. Microbiol.*, v.19, p.34-38, 1984.
- FREED, R.C.; EVENSON, M.L.; REISER, R.F.; BERGDOLL, M.S. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.44, p.1349-1355, 1982.
- FUNG, D.Y.C.; WAGNER, J. Capillary tube assay for staphylococcal enterotoxin A, B and C. *Appl. Microbiol.*, v.21, p.559-561, 1971.
- HERTEN, B.; BOARD, R.G.; MEAD, G.C. Conditions affecting growth and enterotoxins production by *Staphylococcus aureus* on temperature abused chicken meat. *Lett. appl. microbiol.*, v.9, p. 145-148, 1989.
- HUMPHREY, J.H., WHITE, R.G. Serological aspect of the antigen antibody reactions: the detection and measurement of antigen and antibody. *Immunol. for students of medicine*. 3.ed. Oxford: Blackwell, 1971. p.348-407.
- IANDOLO, J.J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Ann. Rev. Microbiol.* v.43, p.375-401, 1989.
- IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHINGAKI, M.; BERGDOLL, M.S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. *J. Clin. Microbiol.*, v.23, p.509-512, 1986.
- JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMAN, P.E. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, v.22, p.837-841, 1971.

- Staphylococcal enterotoxin A and B solid-phase radioimmunoassay in food. *Appl. Microbiol.*, v.26, p.309-313, 1973.
- KOKAN, N.P.; BERGDOLL, M.S. Detection of low-enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* v.53, p.2675-2676, 1987.
- LEE, A.C.M.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: EASMAN, C.F.S. & ADIAM, C. *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academic Press, 1983. v.3, p.558-559.
- LINDROTH, S.; NISKANEN, A. Double antibody solid phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *European J. Appl. Microbiol.*, v.4, p.137-143, 1977.
- MEYER, R.F., MILLER, L., BENNETT, R.W.; MACMILLAN, J.D. Development of monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of *Staphylococcus aureus* enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.283-287, 1984.
- MINOR, T.E. MARTH, E.H. Staphylococcal food poisoning. A review I. Characteristics and isolation of staphylococci, properties of enterotoxins, and epidemiology of staphylococcal intoxications. *Ind. I. Nutr. Dietet.*, v.9, p.161-186, 1972.
- *Staphylococci and their significance in foods*. Amsterdam: Elsevier, 1976. 297p.
- MORGAN, M.; LEE, H. Immunological methods for food analysis. In: TOSELHO, André. *Training course*. Campinas: Fund. Top. Pesq. e Tecnol., 1990.
- MORISSETTE, C.; GOULET, J., LAMOUREUX, G.I. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, n.3, p.836-842, 1991.
- NISKANEN, A.; KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *J. Food Protect.*, v.40, p.543-548, 1977.
- ORTH, D.S. Statistical analysis and quality control in radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxins A, B and C. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.34, p.710-714, 1977.
- LOUDIN, J. Specific precipitation in gels. *Methods Med. Res.*, v.5, p.335-378, 1952.
- PARK, C.E., SZABO, R. Evaluation of the resersed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection on staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in foods. *Can. J. Microbiol.*, v.32, p.723-727, 1986.
- REISER, R., CONAWAY, D.; BERGDOLL, M.S. Detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *Appl. Microbiol.*, v.27, p.83-85, 1974.
- ROBBINS, R.N., GOULD, S., BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, v.28, p.946-950, 1974.
- ROBERN, H., GLEESON, T.M.; SZABO, R.A. Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A and B. *Can. J. Microbiol.*, v.24, p.436-439, 1978.
- SAUNDERS, G.C. & BARTLETT, M.L. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* v.34 p.518-522, 1977.
- SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R.; HOWARD, A. Rapid sensitive assay for staphylococcal enterotoxins and a comparison of serological methods. *Appl. Microbiol.*, v.16, p.1019-1023, 1968.
- SINGH, B.R.; EVENSON, M.L.; BERGDOLL, M.S. Structural analysis of staphylococcal enterotoxins B and C1 using circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Amer. Chem. Soc.*, v.24, p.8735-8741, 1988.
- SUGIYAMA, H.; BERGDOLL, M.S.; DACK, G.M. In vitro studies of staphylococcal enterotoxin production. *J. Bacteriol.*, v.80, p.265-270, 1960.
- SWAMINATHAN, B. & KONGER, R.L. Immunoassays for detecting food-borne bacteria and microbial toxins. In: PIERSON, M.D.; STERN, N.J. *Foodborne microorganisms and toxins: developing methodology*. New York: Marcel Dekker, 1986. p.253-281 (IFT Basic Symposium Series).
- THERASSE, J.; PINON, J.M.; BINDER, P. Detection of staphylococcal enterotoxin B. A comparative study of ELISA and ELIFA systems. *J. Immunol. Methods*. v.128, n.2, p.287-291, 1990.
- THOMPSON, N.E.; GOMES, L.E.; BERGDOLL, M.S. Incidence of antibodies reactive with toxic shock syndrome toxin-1 in bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.151, p.865-867, 1986.
- THOMPSON, N.E., KETTERHAGNS, M.J.; BERGDOLL, M.S. Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins B and C: cross reactivity and localization of epitopes on fragments. *Infect. Immun.*, v.45, p.281-285, 1984.
- TRANter, H.S. & BREHM, R.D. Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. Apud JONES, D., BOARD, R.G.; SUSSUMAN, M. *Staphylococci*. *J. Appl. Bacteriol. Symp.* Oxford, n.19, p.109-122, 1990.
- YOLKEN, R.H. & LEISTER, F.J. Comparison of fluorescent and colorigenic substrates for enzyme immunoassays. *J. Clin. Microbiol.* v.15 p.757-760, 1982.
- ZEHREN, V.L.; ZEHREN, V.F. Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A. *J. Dairy sci.*, v.51 p.634-635, 1968.

Recebido para publicação em 12/09/91