

# MÉTODO RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE TNase ESTAFILOCÓCICA EM LEITE UTILIZANDO MEMBRANA DE DIÁLISE \*

ELISA YOKO HIROOKA<sup>a</sup>  
YUKO YOSHIMOTO<sup>b</sup>  
EDUARDO VICENTE<sup>b</sup>

## RESUMO

A presença de tonuclease em alimentos indica que *S. aureus* atingiu número crítico, suficiente para causar intoxicação. Como a sua concentração atinge apenas a nível de ng nestes produtos, um processo de extração e concentração torna-se fundamental para sua detecção. A utilização de membrana de diálise é proposta como método alternativo para extração de TNase em leite inoculado com *S. aureus* 196-E. As amostras de leite, após tratamento térmico e eliminação de caseína, foram dialisadas em diferentes membranas, com polietileno glicol 6000 e sacarose. A atividade nucleásica no extrato foi intensificada com tratamento térmico, melhorando a sensibilidade da metodologia. A utilização de celofane comercial, assim como de sacarose para concentrar o extrato é viável, propondo-se método rápido de custo acessível para detecção de TNase em leite contaminado com estafilococo.

**PALAVRAS-CHAVE:** TNase, estafilococo enterotoxigênico, membrana de diálise, triagem

## 1 - INTRODUÇÃO

A detecção de termonuclease-TNase em alimentos tem sido desenvolvida para triagem de estafilococos enterotoxigênicos (TATINI et alii, 1976; PARK et alii, 1978; KOUPAL & DEIBEL, 1978), na tentativa de substituir ensaios imunoquímicos de alto custo para enterotoxinas (BERGDOLL & REISER, 1980; FREED et alii, 1982; IGARASHI et alii, 1986).

TNase é uma proteína globular de cadeia simples que contém 149 resíduos de aminoácidos, peso molecular 16.800 d e requer íon  $Ca^{2+}$  para sua atividade, sendo bastante resistente a processamento físico (COTTON et alii, 1979; SERPESU et alii, 1989; EVANS et alii, 1989). Esta característica lhe confere resistência térmica superior a da enterotoxina e capacidade de manter atividade por longo período de estocagem (EMSWILLER-ROSE et alii, 1980; IBRAHIM & BALDOCK, 1981). A sua detecção em produtos alimentícios indica a presença de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g de *Staphylococcus aureus*, número considerado crítico e capaz de desencadear intoxicação alimentar em indivíduos sensíveis (TATINI et alii, 1976).

TNase pode estar presente em reduzidas quantidades em alimentos contaminados, necessitando processo de extração e concentração para análise de atividade enzimática pelo método de LACHICA et alii (1971). TATINI et alii (1976) propuseram precipitação

de TNase com ácido tricloroacético-TCA 3,0 M, seguido de neutralização para pH 8,5, porém esse processo provoca perda significativa de atividade enzimática. Para reduzir a inativação, foram realizadas modificações com adição de protetores, bem como uso de tampão tris 0,5 M pH 10,0 (HIROOKA et alii, a ser publicado).

O presente trabalho estuda a possibilidade de concentrar TNase através de membranas semipermeáveis, a fim de evitar perda de TNase por precipitação com TCA e dispensar a centrifugação subsequente, simplificando a detecção de contaminação do leite com estafilococos enterotoxigênicos, em condição de rotina laboratorial nacional.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Microrganismo

O microrganismo estudado foi *S. aureus* 196-E produtor de TNase e de enterotoxinas A e D, cedido pelo Food Research Institute, da Universidade de Wisconsin, E.U.A.

### 2.2 - Preparo de amostras

Caldo infusão de coração e cérebro-BHI e leite pasteurizado foram inoculados com cultura de *S. au-*

a. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos - CCA/Universidade Estadual de Londrina.

b. Estagiários do curso de Biologia.

\* CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio financeiro.

*reus* 196-E apresentando 0,3 de absorvância a 600 nm, na proporção de 0,1 ml de cultura para 100,0 ml de amostra e incubados a 37°C por 18 horas. A cultura em caldo BHI foi centrifugada a 7.800xg por 15 min a 4°C e adicionada de mertiolate na concentração final de 1:20.000. A cultura em leite foi dividida em duas partes, sendo uma tratada em banho fervente por 20 min antes do processo de concentração.

### 2.3 - Detecção de TNase

A TNase foi detectada pelo método da LACHICA et alii (1971), utilizando-se ágar azul de orto-toluidina-DNA (TDA) pH 10,0, com incubação a 50°C por 4 horas, conforme HIROOKA et alii (1987). O ágar TDA consistiu de 0,3 g de DNA (Bacto DNA 3231-13, Difco), 10,0 g de NaCl, 10,0 g de ágar de alta pureza (Merck), 1,1mg de CaCl<sub>2</sub> em 1 litro de tampão tris pH 10,0. Após dissolução dos componentes, adicionou-se 3,0 ml de azul de orto-toluidina 0,1 M (Merck). O resultado foi expresso em mm de halo de atividade.

### 2.4 - Concentração de TNase pela membrana de diálise

O caldo BHI e leite inoculados foram preparados conforme o ítem 2.2, comparando-se a concentração de TNase em tubo de diálise 133-811363 de INLAB, celofane e cloreto de polivinil (PVC) comercial. A eficiência destas membranas em concentrar amostra foi analisada dialisando-se leite e BHI inoculados com *S. aureus* 196-E, utilizando-se polietileno glicol 6000 e sacarose comercial, deixando as amostras até atingir 10,0 a 30,0% do volume inicial.

#### 2.4.1 - Análise da membrana de diálise

As membranas de diálise foram analisadas quanto à permeabilidade frente TNase e sacarose. A capacidade das membranas em evitar a entrada de sacarose foi avaliada colocando-se tubos de diálise com 10,0 ml de água num becker contendo sacarose comercial, deixando-se reduzir seu volume até 20,0 a 30,0% do volume inicial. O reagente de Benedict (citado em VILELA et alii, 1973) foi utilizado para a detecção de sacarose no dialisado. Para analisar permeabilidade de TNase através da membrana, sobrenadante de *S. aureus* 196-E em BHI foi dialisado em tampão tris 0,05 M pH 8,5 adicionado de 1,0% de proteose peptona nº 3 e atividade nucleásica no dialisato determinada no decorrer de 63 horas, em ágar TDA.

#### 2.4.2 - Avaliação da hidrólise inespecífica do DNA pelo concentrador

A hidrólise inespecífica do DNA causada pela sacarose e PG 6000 foi analisada preenchendo orifícios no ágar TDA com 0,0 a 60,0% destes componentes diluídos em água, BHI, leite, tampão tris 0,05 M e 0,5 M pH 8,5 e o mesmo tampão adicionado de 1,0% de proteose peptona nº 3.

### 2.4.3 - Desenvolvimento de metodologia para detecção de TNase em leite

O leite inoculado e preparado conforme ítem 2.2 foi utilizado para desenvolver método de análise de TNase, comparando a eficiência das membranas de diálise e dos concentradores. A caseína da amostra sem tratamento térmico foi eliminada diminuindo o pH do leite para 4,5 e centrifugando-se a 7.800xg por 10 min a 4°C. Após adição de 1:20.000 de mertiolate no sobrenadante obtido, o pH foi ajustado a 7,0 e procedeu-se diálise com sacarose e PG 6000. As amostras de leite pré-aquecido foram diretamente centrifugadas a 7.800xg por 10 min a 4°C ou filtradas através de gase e algodão e os sobrenadantes obtidos, adicionados de 1:20.000 de mertiolate. A seguir, os sobrenadantes foram divididos em duas porções, sendo uma ajustada a pH 7,0 antes da diálise. A atividade nucleásica das amostras dialisadas foi avaliada em ágar TDA, assim como a perda de atividade durante a estocagem do concentrado foi observada no período de 72 horas.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O celofane comercial apresentou-se como o mais permeável, reduzindo a amostra em diálise para 30,0% do volume inicial após 3 horas. Apresentou porém, a inconveniência de permitir entrada fácil de sacarose na amostra em concentração (tabela 1).

Os resultados da tabela 2 permitem concluir que moléculas de TNase estafilocócica podem atravessar celofane comercial e tubo de diálise 133-811363 durante o processo de concentração, sendo a perda notada a partir de 21 horas para o celofane e mais de 46 horas para o tubo de diálise. Entretanto, este fator não se constituiu em problema na análise, já que segundo a tabela 1, o tempo necessário para concentração está entre 3 a 7 horas para estas membranas. A membrana de PVC não permitiu a perda de TNase nem a entrada de sacarose, porém não foi capaz de concentrar a amostra em estudo.

A tabela 3 mostra a hidrólise inespecífica de DNA provocada pelo uso de concentradores (sacarose e PG-6000), na presença de diferentes diluentes. Quantidades maiores de concentradores causaram hidrólise do DNA, sendo o efeito mais pronunciado com PG 6000. Isto sugere a necessidade de considerar o efeito de concentradores na medida de atividade nucleásica em alimentos, tendo em vista que estes componentes podem entrar na amostra em diálise, interferindo no resultado. Todavia, tanto a sacarose como PG 6000 foram eficientes em concentrar a TNase estafilocócica do leite inoculado com *S. aureus* 196-E (tabela 4). A atividade enzimática no dialisado permaneceu inalterada por 72 horas com boa reprodutibilidade, não havendo necessidade de analisar o extrato no ágar TDA imediatamente após a diálise.

A atividade de TNase aumentou em amostras pré-aquecidas (tabela 4). O mesmo efeito foi observado em amostras submetidas ao processo de extração de TNase com TCA (HIROOKA et alii, a ser publicado). Considerando que íons Ca<sup>2+</sup> são fundamentais para a atividade de TNase (COTTON et alii, 1979; SERPERSU et alii, 1989), o aumento dessa atividade pode

ser explicado pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de caseína, resultante do tratamento térmico e metabolismo microbiano, além da inativação dos queladores de cátions, presentes no leite. Este fenômeno aumenta a sensibilidade do método para triagem de produtos de laticínios contaminados com estafilococos, eliminando simultaneamente nucleases termossensíveis produzidas por outros microrganismos, que tem-se constituído problema na correlação desta enzima com crescimento estafilocócico (BISSONNETTE et alii, 1980; MARSHALL & KAUFMAN, 1981).

O ajuste do pH do leite pré-aquecido para 7,0 não interferiu na atividade nucleásica (tabelas 4 e 5), assim como não se observou redução de atividade no extrato durante armazenamento, sugerindo que além de TNase estar concentrada, provavelmente as impurezas presentes no extrato protegem a enzima da desnaturação. Segundo HAUROWITZ (citado por DENNY et alii, 1971), a interferência é devida à proximidade intermolecular de cadeias polipeptídicas nativas firmemente enoveladas, dificultando a desnaturação.

Considerando que a sacarose apresentou menor interferência em ágar TDA para determinação de TNase, esta foi escolhida para comparar os processos de extração utilizando membrana de diálise em leite

(tabela 5). O celofane comercial de baixo custo apresentou melhores resultados em termos de rapidez, além de não permitir praticamente a passagem de TNase no dialisato (tabela 5). A centrifugação do leite contaminado antes da diálise permitiu obtenção de sobrenadantes límpidos, porém não foi crucial para o melhoramento da metodologia, podendo a caseína precipitada ser eliminada por filtração da amostra pré-aquecida. Embora o método da membrana apresente menor sensibilidade, quando comparado com o processo de extração utilizando TCA (TATINI et alii, 1976; HIROOKA et alii, a ser publicado), a metodologia é mais simples, uma vez que elimina a centrifugação utilizada pelos métodos anteriores. A figura 1 representa o esquema da metodologia proposta.

Deve-se ressaltar que o método rápido aqui proposto é um método de triagem que permite indicar a possível presença de enterotoxina estafilocócica em alimentos, podendo haver a interferência de diversos componentes do alimento na análise (PARK et alii, 1978; EMSWILLER-ROSE et alii, 1980; BOUWERHERTZBERGER et alii, 1981). No entanto, o método proposto é rápido e de baixo custo, acessível portanto a qualquer laboratório que deseje detectar contaminação dos alimentos com microrganismos produtores de TNase, entre eles o estafilococo.

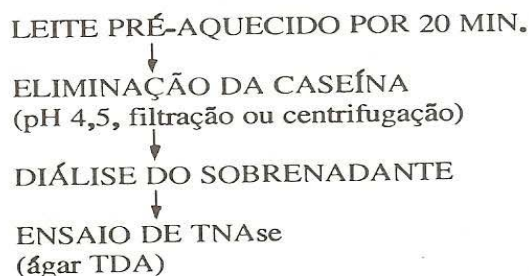


Figura 1 – Detecção de atividade de TNase em leite pelo método de membrana de diálise.

Tabela 1 – Avaliação da passagem de sacarose através das membranas de diálise

Membrana <sup>a</sup>	Tempo de diálise (h)	Volume final (%)	Sacarose
Celofane	03:00	30,0	(+)
TD	07:30	25,0	(+)
PVC	07:30	100,0	(-)
	28:00	100,0	(-)

a – Celofane comercial

TD – Tubo de diálise 133-811363 da INLAB

PVC – Filme de cloreto de polivinil

Tabela 2 – Perda de TNase através da membrana durante o processo de concentração

Membrana	Atividade de TNase no dialisato (mm)			
	Tempo de diálise (h)			
	0	21	46	63
Celofane	9,7	12,0	13,5	14,0
TD	9,7	11,0	11,0	14,0
PVC	9,7	10,0	9,2	10,0

**Tabela 3 – Efeito dos concentradores sacarose e PG 6000 na atividade de TNase do dialisado, utilizando diversos diluentes e membrana de celofane.**

Concentrador	Diluyente	Atividade de TNase no dialisado (mm)						
		Teor de concentrador (%)						
		0	10	20	30	40	50	60
Sacarose	H <sub>2</sub> O destilada	9,0	10,0	10,0	11,0	11,0	11,0	11,0
	Tris 0,05M pH 8,5	9,0	10,0	10,0	11,0	11,0	11,0	11,0
	Tris 0,05M pH 8,5 + pp <sup>a</sup>	9,0	10,0	10,0	11,0	11,0	11,0	11,0
	Leite	9,0	9,0	9,0	10,0	10,0	11,0	11,0
	BHI	10,0	10,0	10,0	11,0	11,0	11,0	11,0
PG 6000	H <sub>2</sub> O destilada	9,0	11,0	11,0	12,0	12,0	12,0	12,0
	Tris 0,05M pH 8,5	9,0	11,0	11,0	12,0	12,0	12,0	12,0
	Tris 0,05M pH 8,5 + pp	9,0	11,0	11,0	12,0	12,0	12,0	12,0
	Leite	9,0	10,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
	BHI	10,0	11,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0

a – pp – proteose peptona nº 3.

**Tabela 4 – Atividade de TNase em leite inoculado com *S. aureus* 196-E e concentrado em tubo de diálise 133-811363.**

Controle	Concentrador	Tratamento <sup>a</sup> Térmico	pH <sup>b</sup>	Atividade de TNase (mm)
Leite				8,5
Sacarose				11,7
PG 6000				13,2
	Sacarose	NF	7,0	10,3
		F	7,0	15,7
		F	NA	15,5
	PG 6000	NF	7,0	9,7
		F	7,0	16,0
		F	NA	15,8

a – NF – Sem tratamento térmico  
F – Com tratamento térmico

b – 7,0 – Ajuste do pH a 7,0 antes da diálise  
NA – Sem ajuste de pH, em torno de 5,0 antes da diálise

Tabela 5 – Atividade de TNase em leite inoculado com *S. aureus* 196-E e dialisado com diferentes membranas, na presença de sacarose.

Tratamento <sup>a</sup> Térmico	pH <sup>b</sup>	Centrifugação <sup>c</sup>	Diálise <sup>d</sup>	Volume final (%)	Atividade de TNase	
					Dialisado	Dialisato
F	NA	(–)	–	100,0	14,0	–
			Celofane	13,2	16,5	10,0
			TD	13,7	15,5	11,0
F	NA	(+) )	–	100,0	15,0	–
			Celofane	10,5	16,0	9,0
			TD	20,5	17,5	9,0
F	7,0	(+) )	–	100,0	14,0	–
			Celofane	20,5	16,0	9,0
			TD	29,5	15,5	9,0

a – F – Com tratamento térmico

b – 7,0 – Ajuste do pH a 7,0 antes da diálise

NA – Sem ajuste de pH, em torno de 5,0, antes da diálise

c – (–) – Filtração

(+) – 7,800 x g / 10 min a 4°C

d – TD – Tubo de diálise 133-811363 da INLAB

### ABSTRACT

*Presence of thermonuclease in foods indicates that S. aureus developed at a critical number, enough to cause food intoxication. As the concentration of this enzyme in foods reaches only the level of ng, extraction and concentration processes are crucial for its detection. The use of dialysis membrane as an alternative method is proposed for TNase extraction from milk inoculated with S. aureus 196-E. Milk samples, after heat treatment and without casein, were dialysed with different membranes against polyethylene glycol 6000 and sucrose. The nuclea-se activity in the extract was increased with heat treatment, improving the sensibility of the method. Both the use of commercial cellophane and sucrose for concentrating the sample is viable, indicating a rapid and cheap method for TNase detection in milk contaminated with staphylococci.*

**KEY-WORDS:** TNase, enterotoxigenic staphylococci, dialysis membrane, screening.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – BERGDOLL, M.S. & REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *J. Food Protect.*, 43 (1) 68-72, 1980.
- 2 – BISSONNETTE, N.; LACHANCE, R.A.; GOULET, J.; LANDGRAF, M. & PARK, C.E. Evidence of thermonuclease production by *Bacillus* spp and enterococci in naturally contaminated cheese. *Can. J. Microbiol.*, 26 (6): 722-5, 1980.
- 3 – BOUWER-HERTZBERGER, S.A.; SOHL-VOS, H.M.; MOSSEL, D.A.A. & MOL, H. False negative results in examining food staphylococcal thermonuclease. *Ant. Leeuwenh.*, 47 (3): 245-6, 1981.
- 4 – COTTON, F.A.; HAZEN, E.E. & LEGG, M.J. Staphylococcal nuclease: proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3',5'-bisphosphate-calcium ion complex at 1,5Å<sup>2</sup> resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (6): 2551-5, 1979.
- 5 – DENNY, C.; HUMBER, J.Y. & BOHRER, C.W. Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.*, 21 (6): 1064-6, 1971.
- 6 – EMSWILLER-ROSE, B.S.; JOHNSTON, R.W.; HARRIS, M.E. & LEE, W.H. Rapid detection of staphylococcal thermonuclease on casings of naturally contaminated fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40 (1): 13-8, 1980.
- 7 – EVANS, P.A.; KAUTZ, R.A.; DOBSON, C.M. & FOX, R.O. A magnetization-transfer nuclear

magnetic resonance study of the folding of staphylococcal nuclease. *Biochem. (Wash.)*, 28 (1): 362-70, 1989.

8 – FREED, R.C.; EVENSON, M.L.; REISER, R. & BERGDOLL, M.S. Enzymelinked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. microbiol.*, 44 (6): 1349-55, 1982.

9 – HIROOKA, E.Y.; YOSHIMOTO, Y.; VICENTE, E. & SOUZA, M.L.R. Avaliação do efeito protetor de componentes peptídicos na TNase estafilocócica. *Semina, Ciências Biológicas/Saúde*, 8 (2): 72-5, 1987.

10 – HIROOKA, E.Y.; VICENTE, E. & YOSHIMOTO, Y. Thermonuclease estafilocócica em leite: processo de extração e manutenção da atividade enzimática. A ser publicado.

11 – IBRAHIM, G.F. & BALDOCK, A.K. Thermostable deoxyribonuclease content and enterotoxigenicity of cheddar cheese made with subnormal starter activity. *J. Food Protect.*, 44 (9): 655-60, 1981.

12 – IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHINGAKI, M. & BERGDOLL, M.S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.*, 23 (3): 509-12, 1986.

13 – KOUPAL, A. & DEIBEL, R.H. Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease

in foods. *Appl. Environ. microbiol.*, 35 (6): 1193-7, 1978.

14 – LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C. & HOEPRICH, P.D. Methachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21: 585-7, 1971.

15 – MARSHALL, R. & KAUFMAN, H.K. Production of deoxyribonuclease, ribonuclease, coagulase, and hemolysins by anaerobic Gram positive cocci, *J. Clin. Microbiol.*, 13 (4): 787-8, 1981.

16 – PARK, C.E.; ELDEREA, H.B. & RAYMAN, M.K. Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as a means of screening foods for growth of staphylococci and possible enterotoxin production. *Can. J. Microbiol.*, 24 (10): 1135-9, 1978.

17 – SERPERSU, E.H.; HIBLER, D.W.; GERIT<sup>†</sup>, J.A. & WILDVAN, A.S. Kinetic and magnetic resonance studies of the glutamate-43 mutant of staphylococcal nuclease. *Biochem. (Wash.)*, 28 (4): 1539-48, 1989.

18 – TATINI, S.R.; CORDS, B.R. & GRAMOLI, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. *Food Technol.*, 30 (4): 64-74, 1976.

19 – VILELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. *Técnicas de experimentos de bioquímica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. p.132.

Recebido para publicação em 18/01/90