

# ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA PARA PRODUÇÃO DE PADRÃO E ELIMINAÇÃO DE INTERFERENTES ALIMENTARES NO MÉTODO DE RPLA

CLÁUDIA MORENO ROSA<sup>1</sup>  
TEREZA CRISTINA ROCHA MOREIRA OLIVEIRA<sup>1</sup>  
ELISA YOKO HIROOKA<sup>1</sup>

ROSA, C. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Enterotoxina estafilocócica para produção de padrão e eliminação de interferentes alimentares no método de RPLA. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.20, n.1, p. 71-78, mar. 1999.

**RESUMO:** A freqüente ocorrência de intoxicação estafilocócica requer desenvolvimento de métodos rápidos de diagnóstico, cada vez mais sensíveis e práticos para a detecção direta de enterotoxinas em alimentos. Considerando que estes métodos são constantemente acompanhados por imprevistos, nesta revisão apresenta-se um ponto de vista sobre os atuais recursos disponíveis, para contornar os problemas oriundos com o lançamento de novas técnicas. Ênfase foi dada aos meios de cultura que facilitam a purificação de enterotoxinas, assim como a eliminação de componentes alimentares no método de aglutinação de látex - RPLA, que consiste de técnica simples com alta sensibilidade para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** estafilococo, enterotoxina, meio de cultura, cromatografia de afinidade, extração.

## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é responsável por surtos de intoxicação alimentar, devido a produção de nove enterotoxinas sorologicamente distintas, denominadas de EEA, EEB, EEC<sub>1</sub>, EEC<sub>2</sub>, EEC<sub>3</sub>, EED, EEE (Bergdoll, 1980), EEG (Munson e Betley, 1991) e EEH (Su & Wong, 1995). O microrganismo é freqüentemente isolado de portadores humanos e de animais, sendo o habitat preferido a região nasal, garganta e pele dos indivíduos sintomáticos ou sãos (Kloos & Schleifer, 1986). *S. aureus* apresenta versatilidade nutricional e capacidade de crescimento em condições ambientais, desenvolvendo-se nos mais variados substratos, com a produção de um número superior a 34 metabólitos, constituídos de toxinas, enzimas e componentes da superfície celular (Iandolo, 1989; Cunha et al., 1996).

Entre os metabólitos extracelulares, a ingestão de enterotoxina desencadeia intoxicação estafilocócica, sendo essa a mais freqüente nos estudos epidemiológicos (Artbuthnott et al., 1990). Os alimentos envolvidos contêm ingredientes nutricionalmente ricos, que permitem o crescimento rápido de estafilococos, sendo 10<sup>6</sup> por grama, a contagem comumente detectada em surtos (Park et al., 1992). Todavia, recentemente Lopes et al (1993) apresentaram 10<sup>5</sup> UFC/g como sendo o número de estafilococos suficiente para causar a intoxicação. A EEA, freqüentemente envolvida em surtos, consiste de uma exoproteína termoestável apresentando baixo peso molecular, capaz de desencadear sintomatologia característica dentro de 2 a 6 horas após a ingestão de produto contaminado (Bergdoll, 1990).

Tendo em vista que a concentração em ng de enterotoxina é suficiente para causar intoxicação, o diagnóstico laboratorial requer método sensível e rápido para a detecção direta, em diferentes produtos alimentícios (Evenson et al., 1988; Park et al., 1996; Hill, 1996). Vários testes rápidos para a detecção de enterotoxinas já foram descritos na literatura, sendo o método de aglutinação das partículas de látex sensibilizadas-RPLA, um dos mais simples e rápido, com a vantagem de estabilidade dos reagentes (Fujikawa & Igarashi, 1988).

A produção de EEA de alta pureza é a primeira etapa essencial para garantir a qualidade de antisoro, já que a detecção direta da enterotoxina em alimentos baseia-se em métodos imunológicos (Bergdoll, 1990). Salienta-se que a produção quantitativa de antígeno microbiano de alta pureza está relacionada, à característica genética da linhagem e ao meio de cultivo, que deve apresentar excelência em termos de produtividade e redução da quantidade de outras exoproteínas.

Aliado a isto, a aplicação direta de métodos imunológicos em extratos alimentares associam-se a reações inespecíficas causadas pelos interferentes químicos, constituídos de açúcares, lipídios e proteínas (Souza-Cunha, 1992; Park et al., 1994; Park et al., 1996). O problema é evidente, principalmente com o método de RPLA, cuja simplicidade não requer etapas de lavagem. A solução consiste na utilização de anti-enterotoxinas altamente específicas, porém anticorpos monoclonais para a reação de aglutinação apresenta certa limitação, já que requer imunoglobulinas contendo duas frações Fab funcionantes. Outra opção para

<sup>1</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos / Universidade Estadual de Londrina, Cx. Postal 6001 - 86051-970 - Londrina - PR

contornar o problema das reações inespecíficas seria o desenvolvimento de um processo eficiente, capaz de eliminar interferentes presentes no extrato alimentar.

A seguir apresenta-se os atuais avanços obtidos, na tentativa de eliminar os constantes problemas surgidos durante o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis, simplificados e rápidos para a detecção direta de enterotoxina estafilocócica em alimentos.

## 2. MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA

Alimentos nutricionalmente ricos, com ênfase ao teor protéico, favorecem a produção de enterotoxina estafilocócica (Fey et al., 1984). Seguindo este princípio, a sua produção visando obtenção de antígeno específico deve-se dispor de meios contendo teor considerável de peptídios, de preferência originários de alimentos que normalmente constituem causas de toxinfecção. Salienta-se que a produção de enterotoxina estafilocócica depende do tipo de toxina, linhagem e composição do substrato. A EEB e EEC são produzidas em maior quantidade, freqüentemente excedendo 100 mg/ml, enquanto que a EEA, EED e EEE raramente excedem concentrações de 5 a 10 mg/ml (Tranter & Brehn, 1990).

Anteriormente, o hidrolizado de caseína NZ-amine NAK e hidrolizado protéico-PHP, isoladamente ou combinados, ambos enriquecidos com niacina e tiamina, consistiram-se dos melhores meios para a produção de enterotoxinas (Bergdoll et al., 1971; Robbins et al., 1974; Su & Wong, 1995). Entretanto, a falta dos ingredientes e a suspensão de produção comercial elegeram o caldo infusão de coração e cérebro-BHI e o caldo tripticaseína de soja-TSB, adicionados de niacina e tiamina como meio de escolha para contornar a dificuldade (Melconian et al., 1983; Lopes et al., 1991; Su & Wong, 1995).

Vários meios de composição definida tem sido desenvolvidos com a finalidade de produzir enterotoxinas, porém nenhum atingiu nível de produção comparável ao meio NZ-amine NAK a 3%, adicionado de 3% de PHP (Miller & Fung, 1973).

As exigências vitamínicas apontaram niacina e tiamina entre os compostos essenciais para o crescimento estafilocócico, porém a adição de extrato de levedura tem substituído estas necessidades (Reiser et al., 1984; Ueno, 1987). Conseqüentemente, a escolha de hidrolizados protéicos adequados, suspenso a 3% ou 4% e suplementado com 1% de extrato de levedura seria opção, para a produção de enterotoxina estafilocócica em escala maior, com baixo custo (Metzger et al., 1973).

Coleman & Abbas-Ali (1977), comparando a produção de exoproteínas em triptona de soja-TSB e caseína de soja adicionado de extrato de levedura-CCY, obtiveram melhor resultado no primeiro. Su & Wong (1995) testaram 6 meios, constituídos de BHI, NZ-Amine a 4% e 6% acrescido de extrato de levedura, triptona de soja-TSB, MHB, THB e ácido casamínico-

CA a 4%, em cultivo sob agitação em frascos ou em saco de diálise. O NZ-Amine a 6% contendo 1% de extrato de levedura, submetido à cultura em saco de diálise apresentou-se melhor para produção de EEA e EED. A maior produtividade decorreu da separação entre células e o meio, através de membrana semipermeável, obtendo-se concentração 5 a 10 vezes superior ao método de frasco sob agitação (Reiser & Weiss, 1969; Robbins et al., 1974).

Entretanto, os resultados comparativos para "scale-up" indicaram limitações, na produção de enterotoxina pela técnica de cultura em saco de diálise, desenvolvido por Donnelly et al. (1968). Portanto, recomenda-se o método de frasco sob agitação, em vista da versatilidade no controle sobre o volume de fermentação (Bergdoll, 1990).

Neste sentido, o desenvolvimento dos meios de cultivo, que facilite o processo cromatográfico para a purificação de enterotoxina estafilocócica torna-se fundamental, para viabilizar a simplificação de processo. A cromatografia de afinidade com RED-A, indicado como melhor método para a obtenção de enterotoxina estafilocócica de alta pureza, requer aplicação de amostras com as características equivalentes às obtidas pela cultura em saco de diálise (Tranter & Brehn, 1990; Kamogae, 1994). O fato se traduz no desenvolvimento de formulações com menor complexidade de componentes orgânicos, que permite elevada produção de enterotoxina, em detrimento a outras exoproteínas (Ueno, 1987).

A tendência aponta o controle sobre balanceamento iônico, capaz de modificar a superfície celular e, conseqüentemente, a liberação de toxinas, como um elemento chave para aumentar o seu teor no sobrenadante.

Comparando-se 21 formulações baseadas em peptona, casitona e triptona suplementados de íons, vitaminas e extrato de levedura, observou-se que adição de íons  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$  e extrato de levedura nos meios com peptona e triptona promoveram maior produção de EEA (Kamogae, 1994).

A presença de íon  $Mg^{2+}$  nas concentrações de 0,4 a 1,5 mM, íon  $PO_4^{3-}$  de 1,44 a 2,87 mM e íon  $K^{+}$  de 1,5 a 3,0 mM em meios desmineralizados aumentaram a produção de EEB em 100% (Tatini et al., 1976).

Walker & Duffs (1980) observaram uma diminuição constante na concentração de  $Mg^{2+}$ , à medida que as células cresciam, seguida de um rápido influxo imediatamente antes da divisão celular. Os autores propuseram participação deste íon na multiplicação celular, cuja diminuição na concentração intracelular permitiria a polimerização da turbulina e a conseqüente formação de fusos; a subsequente mudança a nível de membrana citoplasmática desencadearia uma entrada rápida de  $Mg^{2+}$ , causando a quebra do fusos, com divisão nuclear e celular.

John & Goldberg (1980) estudaram o efeito da carência de íon  $K^{+}$ , no aumento da degradação de proteínas e síntese de RNA em *E. coli* A 33 rel A<sup>9</sup>. A carência do íon  $K^{+}$  resultou em imediata redução até a parada total de crescimento, aliado ao aumento da

degradação de proteínas em 2 a 2,5 vezes, sendo o processo completamente revertido pela reposição iônica.

A presença adequada de íons é decisiva na fisiologia celular. A remoção de íons do meio NAK com alumina afetou drasticamente o desenvolvimento de *S. aureus* S-6, resultando em diminuição do peso seco e modificações na produção das proteínas extracelulares totais, nucleases e coagulase. A reposição iônica conduziu à recuperação celular, porém o excesso novamente causou efeitos adversos, indicando que o equilíbrio iônico desempenha um papel importante nas funções celulares (Hirooka et al., 1987).

Rosa (1997) analisou 30 formulações contendo triptona ou peptona a 3%, adicionados de 1 a 3% de extrato de levedura, 0 a 3 mM de íons  $K^{1+}$  e 0, 1 a 2 mM de íon  $Mg^{2+}$ . A triptona 3%, contendo 2% de extrato de levedura e 3mM de íon  $K^{1+}$ , permitiu melhor produção de EEA, que atingiu concentrações superiores a 200 mg/ml, com níveis relativamente baixos de outras exoproteínas. A adição de íon  $Mg^{2+}$  reduziu gradualmente a quantidade de EEA, sugerindo que a concentração iônica de triptona já supre adequadamente este íon.

Os fatos apontaram que, apesar da literatura indicar a dificuldade no controle da produção de EEA, existe a possibilidade de aumentar a sua concentração, através da composição do meio de cultivo. Aliado a isto, a adição de substâncias como antibióticos, que afetam a superfície celular podem favorecer o efeito, já que aumentam a liberação de toxinas (Herrero, 1992).

### 3. DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA

Estudos indicando que quantidades ínfimas como 100 a 200 ng de EEA produzem sintomas de intoxicação (Evenson et al., 1988), estimulam constante procura de métodos sensíveis, capazes de detectar 1 a 2 ng de enterotoxina por grama de alimentos (Park et al., 1994; Su & Wong, 1995; Park et al., 1996).

Considerando que as enterotoxinas sejam proteínas simples, os métodos químicos são incapazes de detectá-las, devendo-se recorrer a métodos biológicos e imunológicos (Bergdoll, 1990). Recentemente, introduziu-se também métodos genéticos, que detectam diretamente os genes de toxigenicidade, empregando-se "probes" e reação em cadeia de polimerase-PCR (Matthews & Oliver, 1994; Swaminathan & Feng, 1994; Hill, 1996).

Métodos imunológicos detectam enterotoxinas em alimento, porém não distinguem toxina biologicamente ativa de inativa. Referente a 5% de enterotoxinas, colocadas no grupo de toxinas ainda desconhecidas, a atividade biológica poderá ser comprovada somente pela introdução oral de extratos suspeitos, em animais sensíveis (Bergdoll, 1990).

O ensaio biológico, por não diferenciar as toxinas, aliado à dificuldade na manutenção dos animais, restringe-se à detecção e comprovação da existência de novas enterotoxinas (Bergdoll, 1973; Minor & Marth, 1976).

Entre as técnicas de reações imunológicas existentes, preliminarmente desenvolveu-se a técnica de precipitação em ágar ou agarose (Bennett, 1976; Humphrey & White 1971; Barry et al., 1973), aplicando-se a difusão simples unidimensional (Oudin, 1952), difusão dupla (Robbins et al., 1974; Bennett, 1971) e técnica da microlâmina (Zehren & Zehren, 1968; Casman et al., 1969). Os métodos apresentaram sensibilidade, o suficiente para detectar as enterotoxinas em extrato de cultura, recomendando-se a imunodifusão dupla - OSP desenvolvida por Robbins et al. (1974), com limite de detecção de 0,5  $\mu$ g/ml.

Entretanto, em alimentos as linhagens de estafilococos enterotoxigênicos podem produzir 1ng/ml ou menos de toxina (Kokan & Bergdoll, 1987; Evenson et al., 1988), estando portanto, abaixo dos níveis detectáveis pelos métodos anteriormente citados.

A EEA, mais comumente associada a intoxicação alimentar, é encontrada em concentração inferior a 1  $\mu$ g/100g de alimento (Reiser et al., 1974). Considerando a diluição devida a preparação de extrato, torna-se evidente que o teste deve apresentar limite de detecção entre 0,5 a 1,0 ng/ml. Soma-se a isto, a necessidade de procedimento simples e rápido, capaz de ser aplicado diretamente em extrato alimentar (Saunders & Bartlett, 1977; Freed et al., 1982; Fey et al., 1984; Morgan & Lee, 1990; Swaminathan & Feng, 1994).

Neste sentido, desenvolveram-se as técnicas de hemaglutinação passiva reversa-RPHA, aglutinação de látex-RPLA, radioimunoensaio-RIA e ensaio imunoenzimático-ELISA, que apresentam sensibilidade entre 0,1 a 1,5 ng/ml (Silverman et al, 1968; Bergdoll, 1980; Fujikawa & Igarashi, 1988). A hemaglutinação reversa e passiva de Silverman et al. (1968) surgiu como primeiro método promissor para a detecção rápida de enterotoxina. Entretanto, os dois principais problemas consistiram na impossibilidade de acoplar certos anticorpos à superfície do eritrócito e, à ocorrência de aglutinação inespecífica, causada particularmente pelo 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, 1985), apesar de apresentar limite de detecção de 1 a 5 ng/ml e alta especificidade, tem como restrição a utilização de marcador radioativo (Bennett, 1971; Johnson et al., 1971; Thompson et al., 1988).

O ensaio imunoenzimático substituiu o marcador radioativo pela enzima, eliminando definitivamente o risco de contaminação e atualmente consiste num dos métodos de escolha, para a detecção direta de enterotoxina em alimentos (Bergdoll, 1990b; Notermans e Wermans, 1991; Oliveira, 1994). Vários métodos de ELISA foram introduzidos, utilizando anticorpo ou toxina conjugado com fosfatase ou peroxidase (Freed et al., 1982; Fey et al., 1984; Thompson et al., 1988; Notermans & Wermans, 1991; Oliveira, 1994).

Igarashi et al. (1986) e Park & Szabo (1988) melhoraram o teste de aglutinação passiva reversa, substituindo hemáceas pelo látex e introduziram o

método de RPLA. O látex elimina o problema na adsorção de anticorpos e aumenta a sensibilidade para 0,75 ng/ml. Comparado ao método de ELISA, apresenta vantagem referente a simplicidade de execução, rapidez, menor complexibilidade e maior estabilidade dos reagentes. Todavia, a reação inespecífica com determinados componentes alimentares restringe o seu uso (Saunders & Bartlett, 1977; Freed et al., 1982; Fey et al., 1984, Morgan & Lee, 1990). Apesar disto, o ensaio com a etapa única de mistura antígeno anticorpo, sem a necessidade de sucessivas lavagens requeridas para o ELISA, torna o RPLA bastante atraente, com constantes tentativas para superar a inconveniência. Para minimizar a interferência, o látex é sensibilizado com imunoglobulinas purificadas através de cromatografia de afinidade, acoplando-se a própria enterotoxina à sepharose (Genigeorges & Kuo, 1976; Igarashi, 1986; Fujikawa & Igarashi, 1988).

Estudos recentes tem demonstrado, que o ELISA também apresenta problemas de reação inespecífica com determinados componentes alimentares. Park et al. (1996) analisaram o "Kit" imunoenzimático da TECRA e detectaram reações inespecíficas com certos tipos alimentares, constituídos de frutos do mar.

O Kit-RPLA para a detecção de enterotoxinas A, B, C e D comercializados pela OXOID BASINGTOKE, UK utiliza partículas de látex sensibilizadas com as respectivas anti-enterotoxinas e, apresenta limite de detecção de 0,5 ng/ml (Tranter, 1990).

As inovações na metodologia, que introduziram látex de alta densidade para a produção de RPLA, tentaram reduzir o tempo de ensaio de 24 horas, para 4 horas (Igarashi & Fujikawa, 1988).

#### 4. INTERFERENTES ALIMENTARES NA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA

A desvantagem de métodos imunológicos, constituídos de RPLA e ELISA está na ocorrência de reações inespecíficas com determinados componentes alimentares, antígenos microbianos e com os respectivos metabólitos extracelulares (Wieneke & Gilbert, 1987; Rose et al., 1989; Park et al., 1993; Park, 1996; Oliveira & Hirooka, 1996).

As reações inespecíficas decorrem de anticorpos contra diversos componentes inerentes do ambiente, que contaminam o próprio antisoro, utilizado como reagente. Para eliminar reações indesejáveis, o antisoro deve ser produzido em animais jovens, empregando-se antígenos com absoluta garantia na pureza. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos de alta reatividade é uma opção ideal, assim como a obtenção de imunoglobulinas específicas, submetendo-se o antisoro em coluna de afinidade sepharose 4B ligada com EEA (Genigeorges & Kuo, 1976). O processo tem sido etapa obrigatória no preparo de reagentes imunológicos, destinados a preparo de Kits comerciais para RPLA (Fujikawa & Igarashi, 1988).

Souza-Cunha (1992) alerta sobre as freqüentes reações inespecíficas, ocorridas durante a detecção de enterotoxina estafilocócica pelo método de RPLA em produtos lácteos, sugerindo a interferência de metabólitos microbianos e sacarose.

Reações inespecíficas com Kit TECRA, que emprega ELISA preparado com anticorpos policlonais ocorrem em alimentos com elevada contaminação por *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp. (Park, 1992). Alimentos contendo certos frutos do mar como mariscos e ostras, também são fontes de reações falso positivas, pelo método de ELISA (Park, 1993).

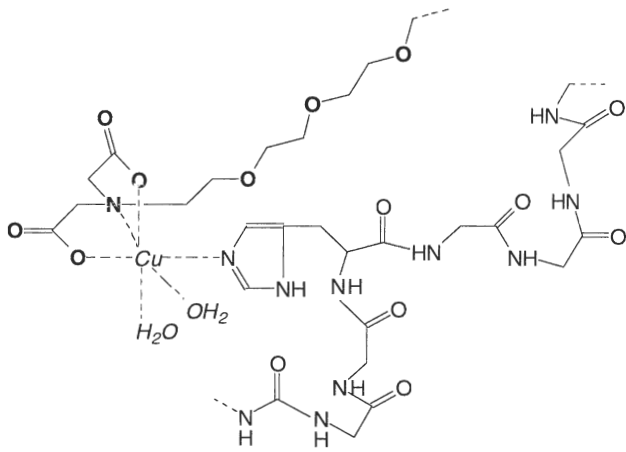
No método de RPLA, alimentos que compõem cardápios rotineiros como maionese, queijo e creme isentos de contaminação microbiana causam resultados falso positivos, indicando que componentes lipídicos, protéicos e açúcares determinam a inespecificidade (Kamogae, 1994; Porto & Silva, 1995).

Recentemente, Park et al. (1996) propuseram uma solução para a eliminação de interferentes no método de ELISA, através de pré-tratamento do alimento com soro animal. Entretanto, o processo fica restrito a determinados tipos alimentares e, dependente da variação de soros utilizados para absorção.

No momento, ainda o melhoramento no preparo dos extratos constitui etapa universal, aplicável nos mais diversos produtos. O objetivo da extração, etapa obrigatória precedente a análise, consiste na transferência de enterotoxinas presentes no alimento para a fase aquosa, eliminando as substâncias interferentes (Morrissete et al., 1991; Oliveira, 1994). As proteínas solúveis são eliminadas através da precipitação em pH 4,5 e os lipídios, pela cristalização em baixa temperatura, seguida de centrifugação refrigerada ou tratamento com 10 a 20% de clorofórmio (Freed et al., 1982; Widermann et al., 1989).

Além destes fatores, o analista deve considerar a porcentagem de recuperação da toxina, cuja, quantidade depende da extração, tipo de alimento e da sensibilidade e confiabilidade do método de detecção (Park et al., 1992; Oliveira & Hirooka, 1996).

A cromatografia de afinidade, denominada de "cooper chelate sepharose gel" surgiu como metodologia capaz de solucionar os problemas acima mencionados, já que permite concentrar enterotoxina, com simultânea eliminação de grande quantidade de contaminantes (Dickie & Akhtar, 1989). A cromatografia de afinidade se define como variação da cromatografia de adsorção, onde a molécula desejada é separada específica e reversivelmente através de uma substância ligante, imobilizada no suporte insolúvel. Em "cooper chelate sepharose", a substância ligante é o íon cobre imobilizado na matrix de sepharose, que seletivamente retém as moléculas de enterotoxina estafilocócica, seguida de eluição com imidazol (Porath et al., 1975). A figura 1 esquematiza a provável interação existente, durante o processo de separação das moléculas protéicas.



**Figura 1.** Interação entre moléculas protéicas com íon  $\text{Cu}^{2+}$  (Fonte: Pharmacia LKB Biotechnology, 1988).

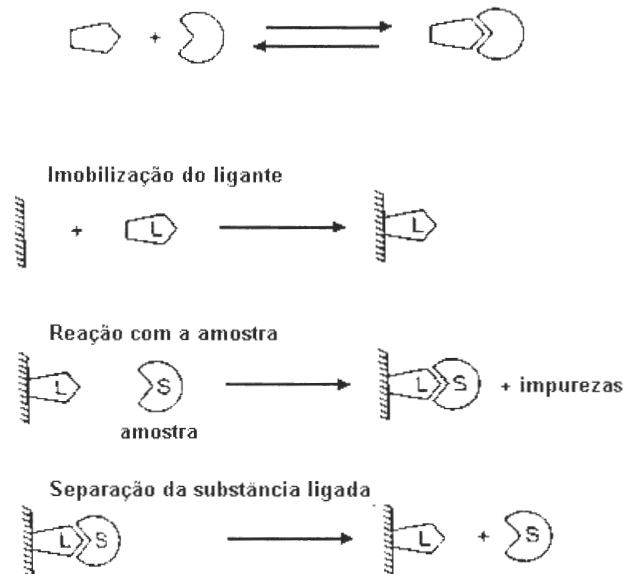
A cromatografia de afinidade com íons imobilizados na sepharose, destinados especificamente para a purificação de proteínas foi primeiramente descrito por Porath et al. (1975). Lönnerdal & Keen (1982) aperfeiçoaram a metodologia, concedendo-lhe alta capacidade, poder de resolução e facilidade na regeneração do gel, que permite a reutilização imediata para novas amostras de alimentos.

O mecanismo se fundamenta na formação de complexos entre resíduos de aminoácidos, representados pela histidina e cisteína, com os íons  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{4+}$  (Lönnerdal & Keen, 1982; Shung et al., 1994). A ligação é pH dependente, sendo que aminoácidos ligam-se ao íon metálico em pH 6,0-8,0. A eluição de proteínas ocorre diminuindo-se o pH e aumentando-se a força iônica, como demonstra a figura 2.

Dickie & Akhtar (1989) aplicaram coluna de sepharose 6B ligada a íons cobre e testaram o eluído, perante a presença de enterotoxina estafilocócica, pelo

método de RPLA. A metodologia eliminou as reações falso positivas, oriundas de extratos preparados com salame, batata, presunto, queijo "cheddar", bolo de fruta, ovo cozido, pizza e leite. O procedimento é também válido para a recentemente descoberta EEH, já que Bergdoll et al. (1996) concentraram e eliminaram possíveis interferentes em extrato de queijo, empregando-se o método de RPLA e ELISA.

Em suma, as constantes inovações no diagnóstico rápido de enterotoxinas estafilocócicas, afim de viabilizar aplicação a nível de controle de qualidade, exigem cada vez mais processos capazes de obter reagentes a custo reduzido, associado à simplificação técnica. Resta ainda desenvolver procedimentos práticos, adequando a coluna de afinidade com íons cobre, passível de ser lançado na rotina laboratorial.



**Figura 2.** Princípio da coluna de afinidade com íons cobre (Fonte: SHUNG et al., 1994).

ROSA, C. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Staphylococcal enterotoxin for standard production and remotion of food interferents in RPLA assay. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.20, n.1, p. 71-78, mar. 1999.

**ABSTRACT:** The frequency of staphylococcal intoxication requires constant improvements to provide more sensitive and practical assays for enterotoxins detection in foods. Considering that such an advantage is always related to an unexpected events, this view point approaches about recent available resources to reduce the problems associated with new techniques. Emphasis was appointed to the culture formulations for enterotoxin purification, as the remotion of food components which interfere with the most simplified method of enterotoxin detection, the latex agglutination assay- RPLA.

**KEY WORDS:** staphylococci, enterotoxin, culture medium, affinity chromatography, extraction.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; AZAVEBO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. In: JONES, D.P.; BOARD, K.G.; SUSSUMAN, M. Staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symp.*, Oxford, n.19, p.101-107, 1990.
- ARESON, P.D.W.; CHARM, S.E.; WONG, B.L. Determination of staphylococcal enterotoxins A and B in various food extracts, using staphylococcal cells 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.
- BENNETT, R.W. Microbiological methods. *J. Adac.*, v.54, p.1037-1038, 1971.
- BERGDOLL, M.S. The Staphylococcal enterotoxins - an Update. J. Jeljaszewics: The staphylococci, *Zbl. Bakt. Suppl.*, v.14, p.247-254, 1985.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.10, p.91-100, 1990.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.10, p.91-100, 1990b.
- BERGDOLL, M.S.; BENNETT, R.V. Staphylococcal enterotoxin. In: COMPEDIUM OF methods for the microbiological examination of foods. Washington: Marvin L. Speck, 1976, p. 387-416.
- BERGDOLL, M.S.; REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *J. Food Protect.*, v.43, n.1, p.68-72, 1980.
- BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *J. Milk Food Technol.*, v.36, p.610-612, 1973.
- BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N.; WEISS, K.F. Identification of enterotoxin E. *Infect. Immunity.*, v.4, n.5, p.593-595, 1971.
- 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.
- COLEMAN, G.; ABBAS ALI, B. Comparison of the patterns of increase in a toxin and total extracellular protein by *Staphylococcus aureus* (Wood 46) growth in media supporting widely different growth characteristics. *Infect. immun.*, v.17, n.2, p.278-281, 1977.
- CUNHA, M.L.R.S.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Generalidades sobre enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. *Rev. Ciência Farm., SP*, v.17: p.9-22, 1996.
- DICKIE, N.; AKHTAR, M. Concentration of staphylococcal enterotoxin from food extract using cooper chelate sepharose. *J. Food Protect.*, v. 52, p.903-905, 1989.
- DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, A.A. Production of enterotoxin A in milk. *Appl. Microbiol.*, v.16, p.917-924, 1968.
- 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.
- FUJIKAWA, H.; IGARASHI, H. Rapid latex agglutination test for detection of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A.*, v.258, p.360-367, 1988.
- GENIGEORGES, C.; KUO, J.K. Recovery of staphylococcal enterotoxins from foods by affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.3, p.274-279, 1976.
- HERRERO, F. *Estafilococos enterotoxigênicos em portadores assintomáticos: isolamento e efeito de oxacilina na produção de proteínas extracelulares de interesse em alimentos*. Londrina, 1992. 192p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.
- HILL, W.E. The polymerase chain reaction: applications for the detection of food borne pathogens. *Critical Rev. In Food Sci. Nutrit.*, v.36, n.1e2, p.123, 1996.
- HIROOKA, E.Y.; SALZBERG, S.P.C.; PAGNOCCA, F.C. Adição de íons e conalbumina a meio hidrolisado de caseína. Efeito em atividades de *Staphylococcus aureus*, linhagem S-6. *Naturalia*, p.15-22, 1987.
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, v.23, n.3, p.509-512, 1986.
- JOHN, A.C.S. & GOLDBERG, A.L. Effect of starvation for potassium and other inorganic ions on protein degradation and ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v.143, n.3, p.1223-1233, 1980.
- JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMAN, P.E. Staphylococcal enterotoxin A and B: solid phase radio immunoassay in food. *Appl. Microbiol.*, v.26, p.309-313, 1973.
- JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, P.E.; KAUFFMAN, P.E. Staphylococcal enterotoxin B: Solid phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, v.22, p.837-841, 1971.
- KAMOGAE, M. Produção e purificação de enterotoxina estafilocócica A e sua aplicação em testes imunológicos rápidos em alimentos. 1994. (Tese de mestrado- Universidade Estadual de Londrina-Paraná).
- KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL (Nom. cons. Opin. 17 Jud. comm. 1958,153). In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; HOLT, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Williams, 1986. v. 2.
- KOKAN, N.P.; BERGDOLL, M.S. Detection of low-enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, p.2675-2676, 1987.
- LINDROTH, S.; NISKANEN, A. Double antibody solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *European J. Appl. Microbiol.*, v.4, p.127-143, 1977.

- LÖNNERDAL, B.; KEEN, C.L. Metal chelate affinity chromatography of proteins. *J. Appl. Biochem.*, v.4, p.203-208, 1982.
- LOPES, H.R.; NOLETO, A.L.S.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxins A, B and E by sac culture. *J. Food Prot.*, v.54, p.650-652, 1991.
- LOPES, H.R.; NOLETO, A.L.S.; LAS HERAS, M. D.; BERGDOLL, M.S. Selective enterotoxin production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produce more than one enterotoxin. *J. Food Protect.*, v.56, n.6, p.538-540, 1993.
- MATTHEWS, K.R.; OLIVER, S.P. Differentiation of *Staphylococcus* species polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. *J. Protect.*, v.57, n.6, p.486-489, 1994.
- MELCONIAN, A.K.; FLANDROIS, J-P; FLEURETTE, J. Modified method for production and purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.45, n.3, p.1140-1143, 1983.
- METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D.; COLLINS, W.S. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B release (excretion) under controlled conditions of fermentation. *Appl. Microbiol.*, v.25, p.770-773, 1973.
- MILLER, R.D.; FUNG, D.Y.C. Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in chemically defined medium. *Appl. Microbiol.*, v.25, p.800-806, 1973.
- MINOR, T.E.; MARTH, E.H. Staphylococci and their significance in foods. Amsterdam, Elsevier, p.297, 1976.
- MORGAN, M.; LEE, H. Immunological methods for food analysis. In: TOSELHO, A. Training course. Campinas: Fund. Trop. Pesq. Tecnol., 1990.
- MORISSETTE, C.; GOULET, J.; LAMOUREUX, G. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, n.3, p.836-842, 1991.
- MUNSON, S.H.; BETLEY, M.J. Partial characterization of a new staphylococcal enterotoxin gene. IN: Abstracts of the of the 91st General Meeting of the American Society for Microbiology. B6, p.31, 1991.
- NOTERMANS, S.; WERNARS, K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. *Int. J. Food Microbiol.*, v.12, p.91-102, 1991.
- OLIVEIRA, T.C.R.M. *Produção de reagentes imunológicos para a detecção direta de enterotoxina estafilocócica A em alimentos*. Londrina, 124p. 1994. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina - Paraná.
- OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Avaliação de métodos de extração e concentração de enterotoxina estafilocócica A em alimentos. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*, v.16, n.2, p.120-125, 1996.
- 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.
- OUDIN, J. Specific precipitation in gels. *Methods Med. Res.*, v.5, p.335-378, 1952.
- PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M.K. Nonspecific reaction of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay Kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.8, p.2509-2512, 1992.
- PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M.K. Evaluation of commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, n.2, p.677-681, 1994.
- PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M.K. Simple solutions to false positive staphylococcal enterotoxin assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay Kit (TECRA). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p.2210-2234, 1993.
- 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. *Can. J. Microbiol.*, v.32, p. 723-729, 1988.
- PARK, C.E.; WARBURTON, D.; LASSEY, P.J. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in food with an enzyme immunoassay kit (TECRA). *J. Food Protect.*, v.59, n.4, p. 390-397, 1996.
- PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY. Affinity chromatography, principles and methods. Uppsala, Lunzsöretagen, 112p. 1988.
- PORATH, J.; CARLSON, J.; OLSSON, I; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v.258, p.598-599, 1975.
- PORTO, E.; SILVA, E.N. *Staphylococcus aureus* em abatedouro industrial de frangos: origem, disseminação e resistência térmica de cepas isoladas de carcaças. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.47, n.3, p.417-433, 1995.
- REISER, R.F.; WEISS, K.F. Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. *Appl. Microbiol.*, v.18, p.1041-1043, 1969.
- REISER, R.; CONAWAY, D.; BERGDOLL, M.S. Detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *Appl. Microbiol.*, v.27, p.83-85, 1974.
- REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A.L. Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C<sub>3</sub>. *Infect. Immun.*, v.45, p.625-630, 1984.
- ROBBINS, R.N.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detection of the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, v.28, p.946-950, 1974.
- ROBERN, H.; GLEESON, T.M. The use of polyethylene glycol in radioimmunoassay of staphylococcal enterotoxins. *Can. J. Microbiol.*, v.24, p.765-766, 1978.
- ROSA, C.M. *Produção de enterotoxina estafilocócica A para testes imunológicos rápidos em alimentos e redução de interferentes na aglutinação de látex- RPLA*. Londrina, 1997. 116p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina-PR.
- ROSE, S.A.; BANKES, P.; STRINGER, M.F. Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination SET-RPLA Kit. *Int. J. Food Microbiol.*, v.8, p.65-72, 1989.
- 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.
- SHUNG, B.H.; BAILEY, D.; ARNOLD, S.H. Metal affinity partitioning. *Methods in Enzymology*. Academic, p.167, 1994.
- SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R.; HOWARD, A. Rapid sensitive assay for staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Microbiol.*, v.16, p.1019-1023. 1968.
- SOUZA-CUNHA, M.L.R. *Estafilococos enterotoxigênicos: efeito de cultura mista em leite, extrato de soja e parâmetros causadores de injúria celular*. 1992. 200p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina-Paraná.

- 
- SWANINATHAN, B.; FENG, P. Rapid detection of food borne pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.48, p.401-426, 1994.
- SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, n.4, p.1433-38, 1995.
- TATINI, S.R.; CORDS, B.R.; GRAMOLL, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. *Food Technol.*, v.30, p.64-74, 1976.
- 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, n.4, p.865-867, 1988.
- TRANter, H.S. Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness. *The Lancet*, v.27, p.1044-1046, 1990.
- TRANter, H.S.; BREHM, R.D. Production, purification, and identification of the staphylococcal enterotoxins. In: JONES, D. (Ed.) *Staphylococci*. Oxford: Blackell Scientific Publications, 1990. p. 109-122.
- UENO, M. Enterotoxina estafilocócica tipo B: produção, purificação e obtenção de antisoro. Campinas - SP, 1987. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- WALKER, G.M.; DUFFUS, J.F. Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. *J. Cell Sci.*; v.42, p.329-356, 1980.
- WIENEKE, A.A.; GILBERT, R.J. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, v.4, p.135-143, 1987.
- WINDEMANN, H.; JÜRG, L.; MAURER, M. ELISA with enzyme amplification for sensitive detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.8, p.25-34, 1989.
- 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.