

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária

Fabiano Costa Santiliano¹; Bethânia Ribeiro de Almeida²; Mariana Drummond Costa Ignacchiti³; Olavo dos Santos Pereira Junior⁴

¹ Mestre em Biociências e Biotecnologia. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, Alegre, Espírito Santo. santiliano@cca.ufes.br

² Mestre em Ciências Veterinárias. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, Alegre, Espírito Santo. bethanialmeida@yahoo.com.br

³ Pós-doutoranda no Programa de Ciências Veterinárias. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, Alegre, Espírito Santo. marianadci@gmail.com

⁴ Professor Doutor do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, Alegre, Espírito Santo. olavospjr@uol.com.br

Resumo

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas que pertencem à categoria B de agentes de risco biológico, cuja exposição em humanos e animais de criação leva a intoxicação alimentar, estimulação de células T, imunossupressão e até morte. O risco de exposição à enterotoxina está associado à facilidade de sua

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.

obtenção e disseminação em aerossóis, alimentos e água. Devido ao impacto epidemiológico da exposição acidental ou intencional, há necessidade de diagnóstico rápido, de alta sensibilidade e especificidade, e de protocolos eficientes de terapia. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise comparativa dos principais parâmetros adotados pelos diferentes métodos utilizados na detecção de enterotoxinas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, diagnóstico

Comparative analysis of the detection methods of staphylococcal enterotoxins of medical and veterinary importance

Abstract

Staphylococcal enterotoxins are proteins that belong to risk Category B of biological agents, the exposure to which results in food poisoning, T cell stimulation, immunosuppression to death in humans and livestock. The risk of exposure to enterotoxins is associated with the availability and ease of dissemination by aerosols, foodstuff and water. Given the epidemiological impact of accidental or intentional exposure, there is a need for rapid diagnostics, of high sensibility and specificity, and for efficient therapeutic protocols of intervention. The aim of this work was realize comparative analyses of the main parameters about different methods utilized in the enterotoxins detection.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, diagnose

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus constituem a principal causa de infecções hospitalares, infecções de instrumentos cirúrgicos e infecções associadas a procedimentos médicos, sendo responsáveis por 35% dos óbitos. Estão associadas à doenças provocadas por contaminação alimentar devido à

liberação de enterotoxinas nos alimentos e à síndrome do choque tóxico por liberação de superantígenos na corrente sanguínea (1).

Além de ser um problema de ordem de saúde pública, a presença das enterotoxinas resulta em perda econômica para o produtor de leite. Ainda, as enterotoxinas estão classificadas na Categoria B de agentes de risco biológico e são consideradas de fácil disseminação e, se distribuídas acidental ou intencionalmente na população, resultam em morbidade moderada e mortalidade baixa.

Os problemas associados às enterotoxinas alertam sobre a necessidade de rápida detecção em produtos de consumo humano, para que os tratamentos sejam providenciados antecipadamente a doença clínica.

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para detecção de enterotoxinas. Basicamente se resumem a ensaios biológicos e imunológicos. Os ensaios imunológicos são mais sensíveis e específicos e são base para detecção das enterotoxinas identificadas sorologicamente. A quantidade de enterotoxinas requerida para causar doença em homens depende da susceptibilidade dos indivíduos, dessa forma, o ensaio diagnóstico, além de específico, deve ser sensível o suficiente.

Diante disso este trabalho apresenta como objetivo realizar uma análise comparativa dos métodos utilizados na detecção de enterotoxinas estafilocócicas e realizar um levantamento dos métodos utilizados na detecção de enterotoxinas, além de analisar e comparar parâmetros como tempo, custo de realização, especificidade e sensibilidade, traçando as principais vantagens e desvantagens associadas à cada uma das técnicas.

2. *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* normalmente está associada à colonização assintomática da pele, orofaringe e trato gastrointestinal e urogenital. No entanto, se as barreiras das mucosas forem rompidas ou ocorrer deficiência no sistema imunológico do hospedeiro, estes

microorganismos podem causar elevada morbidade e mortalidade em humanos e outros animais, originando desde lesões superficiais na pele como bolhas, abscessos, acnes e furúnculos até doenças de maior gravidade como pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, meningite, celulite bacteriana, queratite, infecções do trato urinário e septicemia e mastite em rebanhos leiteiros.

A transmissão de *S. aureus* é frequentemente feita através de contato direto com um indivíduo infectado, embora possa ocorrer também por contato com aerossóis. Recém-nascidos, vítimas de traumas, pacientes queimados, usuários de drogas endovenosas, pacientes com doenças crônicas de pele, diabéticos em uso regular de insulina e pacientes em hemodiálise são freqüentemente colonizados por grandes cargas bacterianas (2).

Também constituem a principal causa de infecções hospitalares, infecções de instrumentos cirúrgicos e infecções associadas a procedimentos médicos, sendo responsáveis por 35% dos óbitos. Em indivíduos imunossuprimidos, tais como pacientes infectados pelo HIV, transplantados ou em tratamento quimioterápico, as infecções pelo *S. aureus* são as principais causas de complicações, com alto grau de morbidade e mortalidade. Estão associadas à doenças provocadas por contaminação alimentar devido à liberação de enterotoxinas nos alimentos e à síndrome do choque tóxico por liberação de superantígenos na corrente sanguínea (1).

3. Enterotoxinas secretadas por *Staphylococcus aureus*

As enterotoxinas são proteínas monoméricas de massa molecular variando de 22-30 kDa, não glicosiladas, e de longa vida média, que são secretadas e acumuladas durante a fase exponencial do crescimento *in vivo* e *in vitro* das diferentes cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas. São altamente estáveis, resistem a muitas enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina explicando sua atividade no sistema digestivo, e são altamente resistentes ao calor (4). Essas proteínas, também conhecidas como toxinas pirogênicas, em

quantidades na ordem de microgramas (3,5 - 150 µg, dependendo da sensibilidade da espécie e do indivíduo) estão relacionadas a episódios de intoxicações alimentares (3) após a ingestão de alimento contaminado, afetando cerca de 1,2 milhões de pessoas anualmente, resultando numa perda econômica de cerca de 1,5 bilhões de dólares.

Em temperaturas inferiores a 60°C, muitas cepas produzem enterotoxinas, que uma vez entrando no intestino do hospedeiro, tem a habilidade de cruzar a parede intestinal e ganhar acesso ao sistema imune. Após 4 h de ingestão, estas toxinas interagem com vários alvos celulares desencadeando reações biológicas e fisiológicas que conduzem às manifestações clínicas características da intoxicação: náuseas, dores abdominais, diarreia e vômito (3,2). Os sintomas geralmente desaparecem 24 h após a infecção, porém, óbitos entre neonatos e idosos não são raros.

As enterotoxinas exibem semelhanças tanto nas suas múltiplas atividades biológicas quanto nas suas seqüências peptídicas (3). Distinguem-se, todavia, umas das outras, pela presença de epítomos específicos. Assim sendo, as diferentes cepas enterotoxigênicas podem expressar toxinas antígenicamente distintas com atividades biológicas similares.

S. aureus secreta diversas enterotoxinas com múltiplos sorotipos SEA, SEB, SEC₁₋₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEQ, SER e SET. Está presente em 30% da população mundial. Este alto percentual pode ser um fator de prevalência de contaminação em alimentos. Condições de higiene inadequadas, temperatura ideal e condições impróprias durante a fabricação, são implicadas como a etiologia primária dos casos de contaminação alimentar (4).

4. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas

Além de ser um problema de ordem de saúde pública, a presença das SEs resulta em perda econômica para o produtor de leite. A infecção intramamária em gado leiteiro com *S. aureus* causam a doença típica de

mastite, que resulta em perda da produção e da qualidade do leite para consumo (5).

Ainda, as enterotoxinas estão classificadas na Categoria B de agentes de risco biológico e são considerados de fácil disseminação e, se distribuídas acidental ou intencionalmente na população, resultam em morbidade moderada e mortalidade baixa. Por causa da situação de bioterrorismo, os Institutos de Saúde dos EUA (NIH) e o Centro para o Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) colocaram essas toxinas na lista de agentes biológicos que têm o potencial de ser utilizadas como armas biológicas.

Os problemas associados às enterotoxinas alertam sobre a necessidade de rápida detecção em produtos de consumo humano, para que os tratamentos sejam providenciados antecipadamente a doença clínica.

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para detecção de enterotoxinas. Basicamente se resumem a ensaios biológicos e imunológicos. Os ensaios imunológicos são mais sensíveis e específicos e são base para detecção das enterotoxinas identificadas sorologicamente. A quantidade de enterotoxina requerida para causar doença em homens depende da susceptibilidade dos indivíduos, dessa forma, o ensaio diagnóstico, além de específico, deve ser sensível o suficiente.

4.1. Detecção baseada em ensaios biológicos

A maioria dos ensaios biológicos utiliza macacos, gatos e cobaias. As enterotoxinas são detectadas pela sua atividade emética em macacos. Classicamente, as amostras suspeitas são aplicadas intragastricamente em macacos Rhesus jovens e os efeitos eméticos podem ocorrer em até cinco horas após ingestão, caso a amostra contenha alguma enterotoxina. Dentre as desvantagens deste método estão a variação na sensibilidade dos animais, a inabilidade de diferenciação entre os sorotipos das enterotoxinas, o desenvolvimento de resistência em animais a repetidas administrações, além do alto custo dos ensaios.

Em gatos, SEC só é capaz de produzir efeitos eméticos quando utilizada cinco vezes acima da concentração de SEA ou SEB. Além das SEs, outras substâncias tóxicas presentes no meio de cultura são capazes de causar vômitos nestes animais. Dessa forma, o resultado deve ser analisado criteriosamente.

A injeção cutânea de toxina após injeção intravenosa com azul de Evans (1%) em cobaias sensibilizadas com imunoglobulina E anti-SEB resulta na produção de uma área sensibilizada de aproximadamente 5 mm de diâmetro. Por este método é possível detectar 10 pg de enterotoxina num período de dez a quinze minutos, porém é impraticável o uso deste ensaio para analisar um grande número de amostras para SEB (2).

4.2. Detecção baseada em ensaio enzimático imunoabsorvente

O ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma ferramenta fundamental na detecção de agentes biológicos. Baseado nos princípios de interações antígeno-anticorpo, o ELISA permite uma fácil visualização de resultados e pode ser finalizado sem a adição de materiais radioativos (6).

Uma variedade de técnicas qualitativas para detecção dessas toxinas está disponível no mercado. Essas técnicas incluem os ensaios imunoabsorventes radioativos e os kits EIA (*enzyme immunosorbent assay*), alguns dos quais estão disponíveis como kits comerciais. A sensibilidade dessas técnicas difere, e o menor limite de detecção tem sido de 0,1 ng/mL de enterotoxina B estafilocócica (SEB) com o kit SET-EIA.

Vernozy-Rozand (7), compararam especificidade e sensibilidade de três kits (VIDAS SET - bioMérieux, VIDAS SET2 - bioMérieux e TRANSIA PLATE - Diffchamb, Lon, France) disponíveis no mercado para detecção de SEs. Realizaram ensaios em diversos tipos de alimentos, a saber: cozidos, crus (*delicatessen* e produtos do mar), enlatados, líquidos, desidratados e derivados do leite. Desses alimentos, apenas os crus apresentaram falso-positivos, com

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.

especificidade de 82% e 78%, para os kits, VIDAS SET e TRANSIA PLATE, respectivamente.

Quanto à sensibilidade, o kit VIDAS SET2 foi o melhor e os resultados foram comparáveis com os imunoenaios *Western blot*, biosensores bidifrativos, e sensores baseados em fluorescência. Vale ressaltar que os tempos necessários para realizar os ensaios são de oitenta minutos para VIDAS SET e VIDAS SET2 e cento e quarenta e cinco minutos para TRANSIA PLATE. Os dois primeiros, por serem automatizados, podem ser incorporados no programa *Hazard Critical Controle Point*, e serem usados para análise de enterotoxinas em larga escala.

Também foram considerados dois outros métodos capazes de detectar toxinas em amostras mais difíceis como leite seco (contendo 5% de umidade). Esses métodos são o biosensor de ressonância de superfície de plasma (8) e o citômetro imunomagnético (9).

Além dos métodos qualitativos, também existem os quantitativos. Sasaki (10) estabeleceram um imunoenasão específico e quantitativo, utilizando anticorpos monoclonais num sistema, baseado no ELISA sanduíche, o ABS-ELISA (*avidin-biotin sandwich* ELISA). O método é sensível e confiável, comparado com o SET RPLA (DENKA SEIKEN Co., Tóquio) comercial, baseado em aglutinação em látex (quantitativo), porém foi considerado superior porque o tempo requerido para medição é menor (três horas para o RPLA versus dezoito horas para o ABS-ELISA) e a exatidão na determinação da concentração dos antígenos foi maior (desvio padrão de 0,01-0,87 para o ABS-ELISA e de 0,0009-6,2 para o SET RPLA).

Um método sensível e mais rápido foi desenvolvido por Alefantis (11). Neste método utiliza-se um sistema de dois anticorpos onde um anticorpo policlonal anti-SEB está ligado a esferas magnéticas e o outro, um anticorpo monoclonal anti-SEB marcado, está ligado com Alexa flúor 647.

Atualmente, a pesquisa científica e tecnológica está na fase dos microchips, que são arranjos de microelementos individuais contendo várias sondas. Ao contrário dos métodos comuns, os microchips permitem análises

paralelas de amostras, para diversos parâmetros, utilizando baixas quantidades de material. Entretanto, essas análises são feitas de forma sensível, segura e eficiente. As numerosas aplicações dos chips de proteínas, produzidos acoplado-se tais proteínas a uma estrutura bi ou tridimensional, incluem a detecção de marcadores de doenças e alérgenos, estudos de interações entre proteínas em células e em plasma e para análise de proteoma (12).

Os resultados dos imunoenaios podem ser alcançados por vários métodos, como intensidade de fluorescência, pela intensidade de quimioluminescência da proteína conjugada a peroxidase e por espectrometria de massa direta (MALDI TOF) dos elementos do microchip (13).

4.3. Detecção por *Western blot*

A técnica *Western blot* supera alguns dos problemas associados com os ensaios de ELISA. O *Western blot* é um método amplamente usado para análise de proteínas e, assim, tem sido usado para detectar SEA e SEC (14). Em um imunoblot, as proteínas são separadas por tamanho usando a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) ou por ponto isoelétrico usando gel de enfoque isoelétrico, transferido para uma membrana, que é, então, incubada com anticorpos específicos.

Uma vez que o ELISA e o *Western blot* se baseiam em detecção imunológica, os imunoblots apresentam duas vantagens para o teste em alimentos. Primeiro, mesmo que o tratamento térmico possa causar agregados protéicos, os agregados são solubilizados e desnovelados em gel de SDS. Não existe um passo de solubilização em ELISA porque a amostra é diretamente aplicada no anticorpo, e SDS na amostra desnaturaria o anticorpo. Segundo, a reação cruzada entre antígenos pode ser caracterizada em *Western blot*, enquanto no ELISA, eles apenas aumentam o background. No blot, o peso molecular (ou o ponto isoelétrico) identifica o antígeno que está reagindo com o anticorpo.

4.4. Detecção pela PCR

Como técnica moderna da Biologia Molecular, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) também tem sido utilizada na detecção dos genes que codificam enterotoxinas. Ela se faz de forma específica, porém, a amplificação das seqüências não é evidência da toxina no material biológico (10). Entretanto, apesar de ser executado em horas e até mesmo em dias, uma vantagem deste método é o fato de possuir uma alta sensibilidade e precisão, mesmo numa amostra com baixa concentração de microrganismos. É possível amplificar a cópia de uma seqüência para enterotoxina em 1 pg de DNA, o que corresponde a 10 CFU/mL (15).

4.5. Detecção por Imunodifusão

Um dos métodos de referência, a imunodifusão ou técnica de Ouchterlony foi desenvolvida por Casman (16); requer de três a dez dias para obtenção dos resultados. Neste método, a proteína e um anticorpo específico difundem por um gel e a reação entre ambos forma uma linha de precipitação característica de positividade. É um método que detecta cerca de 500 ng/mL de enterotoxina no material suspeito. Esta técnica é aprovada pela Associação Oficial de Análises Químicas (AOAC), adotada pelo FDA e é recomendada como método padrão para avaliação de novos ensaios. Outras variações do método são utilizadas nas técnicas de microlâmina e ótima sensibilidade em placa.

4.6. Detecção por aglutinação em látex

Os testes de aglutinação em látex têm sido utilizados para vários alvos e apesar de não serem métodos padrões de detecção têm mostrado alta sensibilidade e especificidade. Em comparação com outros métodos de detecção são mais rápidos – o tempo varia de um minuto a dezesseis horas, econômicos e fáceis de utilizar, além de não necessitarem de técnicos

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.

especializados para realizá-lo, equipamentos sofisticados ou reagentes de custos mais elevados (17). O teste pode ainda ser carregado para clínicas, pequenos centros de doenças e no campo e realizado ao leito do paciente.

Neste teste, o anticorpo específico adsorvido ou ligado covalentemente ao látex é misturado com a amostra suspeita e é monitorado se há ou não aglutinação. A presença de antígeno na amostra permite reconhecimento pelo anticorpo e aglutinação do complexo formado no látex. Existem algumas modificações do teste, nas quais se utiliza látex colorido ou magnetizado.

5. Análise comparativa entre os principais métodos de detecção

O método de ELISA consiste num dos procedimentos mais amplamente utilizados para a detecção de toxinas de *S. aureus*, em virtude de ser um método rápido, sensível e que permite analisar um grande volume de amostras simultaneamente, além de não ser necessária a utilização de materiais radioativos como na técnica de radioimunoensaio. Apresenta algumas limitações ao uso como a necessidade de equipamentos especiais para a visualização dos resultados, é relativamente caro para a análise de um pequeno número de amostras e alguns de seus componentes podem reagir inapropriadamente de acordo com a composição da amostra utilizada.

Toxinas isoladas de pacientes apresentando sintomas de choque tóxico, também podem ser detectadas por meio de focalização isoelétrica e radioimunoensaio. Esta metodologia mostrou-se altamente sensível, mas não muito específica na diferenciação das diferentes toxinas relacionadas à síndrome.

Orden (14) descreveram uma técnica de imunoblotting combinada com um sistema de eletroforese semiautomatizada para a detecção de enterotoxinas em extratos alimentares. Consiste num teste rápido e as proteínas são detectadas com base na reação com anticorpos específicos e na determinação da massa molecular evitando-se assim o surgimento de

resultados falso-positivos gerados pela interferência da proteína A e de outras proteínas contaminantes.

O método de *Western Blot* seria muito vantajoso para amostras de alimento. Alimentos aquecidos podem apresentar agregação de proteínas que devem ser solubilizadas em gel contendo SDS o que desnaturaria o anticorpo, sendo ineficaz em testes de ELISA onde os anticorpos são aplicados diretamente sobre a proteína. Reações cruzadas podem ser identificadas, pois é possível visualizar o tamanho da proteína que é reconhecida pelo anticorpo utilizado. O teste de ELISA é muito utilizado por ser simples, sensível, rápido e disponível em vários kits comerciais, mas possui algumas limitações: não reage bem em amostras de alimentos aquecidos durante o processamento, podendo gerar resultado falso-negativo; dependendo do tipo de alimento, reações cruzadas podem acontecer gerando um resultado falso-positivo; e, peróxidos presentes naturalmente em certos alimentos podem reagir com os cromógenos presentes no ensaio de ELISA.

O método de RPLA tem sido utilizado na detecção de toxinas de *S. aureus* (18), mostrando-se como um método simples e sensível para a detecção de TSST-1. Não é necessário o uso de equipamentos especiais para visualização dos resultados que são prontamente visíveis através da aglutinação das partículas de látex sensibilizadas quando na presença do antígeno alvo e utilizam quantidades mínimas de anticorpo para a sensibilização das partículas. Entretanto, esta técnica não é indicada quando há necessidade de se processar um grande número de amostras.

Diversos trabalhos têm relatado a utilização da técnica da PCR na detecção de TSST-1 e outras toxinas estafilocócicas, utilizando seqüências específicas para o gene codificante, ou através de sistemas de PCR multiplex (19). Estes sistemas permitiriam a detecção rápida e específica de diferentes genes codificadores de exotoxinas produzidas por *S. aureus* em cultura. Esta técnica serviria somente para identificar cepas portadoras dos genes para toxina e independe da expressão e secreção da toxina, onde seriam mais úteis os métodos imunológicos.

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.

Na tabela 1 são apresentadas comparativamente as principais características dos diferentes métodos utilizados na detecção de enterotoxinas estafilocócicas.

Tabela 1: Características dos principais métodos de detecção de enterotoxinas.

Método de detecção	Vantagem	Desvantagem	Sensibilidade	Especificidade	Custo por amostra	Tempo Necessário
Ouchterlony e variações	Aprovada pela AOAC e adotada pelo FDA	É subjetivo	100 ng/mL	Tipagem	Baixo	18-72 horas
ELISA kits diagnósticos	Sensibilidade	Não distingue proteína A produzida pelos <i>S. aureus</i>	0,2 ng/mL	Tipagem	Moderado	1,5 - 4 horas
Radioimuno-ensaio	Sensibilidade	Utiliza material radioativo	1 ng/mL	Tipagem	Moderado	3-4 horas
Western blot	Há solubilização de agregados	Necessidade de equipamentos exclusivos	100 pg/mL	Tipagem	Moderado	4--6 horas
Aglutinação em látex	Rápido	É subjetivo	2,5 ng/mL	Tipagem	Baixo	20 minutos
Microarranjo	Sistematização	Exige profissional qualificado	100 pg/mL	Tipagem	Alto	1,5 horas
PCR	Sensível e altamente específico	Exige profissional qualificado, a presença do gene não é necessariamente indicativa da presença da proteína	1 pg	Todos os genes	Alto	4-6 horas
Biológico	É possível visualizar o efeito causado pela toxina	Utiliza um animal por amostra	10 pg	Inespecífico	Alto	15 minutos-6 horas

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, dentre os métodos disponíveis para detecção de enterotoxinas, existem vantagens e desvantagens. Os métodos biológicos

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.

ainda são utilizados, entretanto, não quando se deseja determinar a classe da toxina em questão. Para estes métodos existem casos em que é possível determinar a concentração da toxina. De qualquer forma, quando é necessário a detecção de enterotoxinas em um grande número de amostras, a utilização de animais se torna impraticável, devido a quantidade de animais e aos cuidados de manutenção e análise de resultados.

Em comparação com os métodos biológicos, os métodos imunológicos, como o *Western blot*, imunodifusão em ágar, ELISA, aglutinação em látex, PCR, microarranjos, são mais sensíveis, específicos, práticos, rápidos e bem-vistos quando há a necessidade de analisar um grande número de materiais, embora necessitem de certos equipamentos, reagentes e de padronização para que os resultados possam ser analisados com confiabilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- McCormick, J.K., Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Ann. Rev. Microbiol.* 55:77-104.
- 2- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16-34.
- 3- Balaban, N., Rasooly, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1-10.
- 4- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63-76.
- 5- Santiliano, F.C., Almeida, B.R., Ignacchiti, M.D.C., Pereira Junior, O.S. Toxinas de *Staphylococcus aureus* associadas à contaminação de alimentos e de gado leiteiro – Revisão. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 25, Ed. 130, Art. 884, 2010.
- 6- Khan, A. S.; Cao, C. J.; Thompson, R. G., Valdes, J. J. (2003) A simple and rapid fluorescence-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B. *Mol. Cell. Probes* 17: 125-126.
- 7- Vernozy-Rozand, C.; Mazuy-Cruchaudet, C.; Bavai, C.; Richard, Y. (2004) Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 490-494.
- 8- Homola, J.; Dostalek, J.; Chen, S.; Rasooly, A.; Jiang, S.; Yee, S.S. (2002) Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 75: 61-69.

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.

9- Miyamoto, T.; Kamikado, H.; Kobayashi, H.; Honjoh, K.; Iio, M. (2003) Immunomagnetic flow cytometric detection of staphylococcal enterotoxin B in raw and dry milk. *J. Food Prot.* 66: 1222-1226.

10- Sasaki, T.; Terano, Y.; Shibata, T.; Kauamoto, H.; Kuzuguchi, T.; Koyama, E. et al. (2005) Establishment of highly specific and quantitative immunoassay systems for staphylococcal enterotoxin A, B and C using newly-developed monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 49: 589-597.

11- Alefantis, T.; Grewal, P.; Ashton, J.; Khanb, A. S.; Valdes J. J.; Del Vecchio, V. G. (2004) A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-throughput screening. *Mol. Cell. Probes* 18: 379-382.

12- Glökler, J.; Angenent, P. (2003) Protein and microarray technology. *J. Chromatogr.* 797: 229-240.

13- Rubina, A. Y.; Dyukova, V. I. ; Dementieva, E. I.; Stomakhin, A. A., Nesmeyanov, V. A.; Grishin, E. V. et al. (2005) Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochem.* 340: 317-329.

14- Orden, J.A., Goyache, J., Hernández, J., Doménech, A., Suárez, G., Gómez-Lucía, E. (1992) Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis system for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. *Appl. Env. Microbiol.* 58:4083-4085.

15- Cremonesi, P.; Luzzana, M.; Brasca, M.; Morandi, S.; Lodi, R.; Vimercati, C. et al (2005) Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cell. Probes* 19: 299-305.

16- Casman, E. P.; Bennett, R. W.; Dorsey, A. E.; Stone, J. E. (1969) The micro-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.* 6: 185-98.

17- Lee, J. H.; Jeong, J-M.; Park, Y-H.; Choi, S-S.; Kim, Y-H.; Chae, J-S. et al. (2004) Evaluation of the methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2780-2782.

18- Igarashi, H., Fujikawa, H., Shingaki, M., Bergdoll, M.S. (1986) Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.* 23:509-512.

19- Løvseth, A., Loncarevic, S., Berdal, K.G. (2004) Modified Multiplex PCR Method for Detection of Pyrogenic Exotoxin Genes in Staphylococcal Isolates *J. Clin. Microbiol.* 42:3869-3872.