

EXOTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Manuela Figueiroa Lyra de FREIRAS¹, Tereza Cristina LEAL BALBINO²,
Rinaldo Aparecido MOTA³, Tânia Lúcia Montenegro STAMFORD⁴

RESUMO: *Staphylococcus aureus* produz uma grande variedade de exotoxinas: as Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs) que causam intoxicação alimentar estafilocócica, resultante do consumo de alimentos contendo SEs pré-formadas, Toxina Esfoliativa (ET) causadora da síndrome da pele escaldada, principalmente em crianças, e a Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), caracterizada por febre, hipotensão, envolvimento multiorgânico e descamação da pele. Devido à importância desta bactéria para a saúde pública objetivou-se com este trabalho revisar os principais aspectos das exotoxinas estafilocócicas, dando ênfase à caracterização bioquímica, genética e aos métodos de detecção destas toxinas.

Termos de Indexação: Exotoxinas, Saúde Pública, *Staphylococcus aureus*

STAPHYLOCOCCAL EXOTOXINS

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* produces a large variety of exotoxins: staphylococcal enterotoxins (SEs) which cause staphylococcal food poisoning, resulting from the consumption of food containing preformed SEs, Exfoliative Toxin (ET) responsible for the staphylococcal scalded-skin syndrome, mainly in children, and the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) characterized by high fever, hypotension, multiorgan involvement and desquamation of the skin. Due to the importance of this microorganism for the public health, the aim of this study was to review the mainly aspects about staphylococcal exotoxins, including biochemical, genetics and diagnosis characterization.

Index Terms: Exotoxins, Public Health, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

Na medicina humana e medicina veterinária, o *Staphylococcus aureus* é responsável por várias afecções que acometem desde tecido cutâneo até infecções sistêmicas, com destaque nos animais para a infecção da glândula mamária. Assume grande importância na microbiologia de alimentos como agente de intoxicações alimentares devido à produção de enterotoxinas termoestáveis, servindo como indicador higiênico-sanitário na indústria alimen-

tária, visto que o manipulador de alimentos é a principal fonte e veículo deste microrganismo.

Toxinas são comumente substâncias, de origem protéica, produzidas por alguns microrganismos e que contribuem para sua patogenicidade. São classificadas em exo e endotoxinas (KONEMAN et al., 2001). As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas, decorrentes da multiplicação e metabolismo, dos microrganismos. Classicamente são agrupadas em três ti-

¹ Méd. Vet. Doutoranda do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - e-mail manuelaflf@uol.com.br * Autor para correspondência

² Bióloga. Pesquisadora Dr^a. do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ

³ Méd. Vet. Professor Dr. da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

⁴ Nutricionista. Professora Dr^a. da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

pos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem com a transmissão normal de impulsos nervosos; e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As endotoxinas correspondem a porção externa da parede celular (lipopolissacarídeos) das bactérias Gram-negativas, que são liberadas após a morte bacteriana ou mesmo a lise da parede celular (TORTORA et al., 2002).

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são: as enterotoxinas, sorologicamente identificadas como SEA, SEB, SEC₁₋₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (CARMO et al., 2002), SEK (ORWIN et al., 2001) e, recentemente SEL (ORWIN et al., 2003), SEM, SEN, SEO (LOIR et al., 2003) e SEU (LETERTRE et al., 2003); a Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (BERGDOLL et al., 1981); e a Toxina Esfoliativa dos tipos A, B (LEE et al., 1987), C (SATO et al., 1994) e D (YAMAGUCHI et al., 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) podem ser detectadas *in vitro* ou pelas suas atividades biológicas *in vivo*. No entanto, por motivos práticos, a detecção de rotina é realizada por métodos imunológicos como imunodifusão, radioimunoensaio (RIA), aglutinação em látex, imunoblotting e ensaios imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Um método alternativo para verificar a capacidade enterotoxigênica de linhagens de estafilococos é a detecção específica de genes de toxinas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction). Porém, segundo Mclauchlin et al. (2000), apenas a presença desses genes não indica, necessariamente, a capacidade do microrganismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para induzir manifestações clínicas.

O GÊNERO *Staphylococcus*

De acordo com Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) a família

Micrococaceae inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. Na atualidade, segundo Koneman et al. (2001), o gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies.

No homem, a espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é causadora de infecções cutâneas como furunculoses, impetigo e abscessos (MURRAY et al., 1992), infecções orgânicas incluindo osteomielite, endocardite e artrites (SPICER, 2002), intoxicações alimentares (VERAS et al., 2003), síndrome da pele escaldada (LADHANI et al., 1999) e síndrome do choque tóxico (DINGES et al., 2000).

Os estafilococos também secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e collagenase (DINGES et al., 2000), além de outras enzimas como catalase, fibrinolisinase, coagulase e beta-lactamase (SPICER, 2002). A produção destas enzimas e citotoxinas é regulada por elementos genéticos como plasmídios, transposons e profagos, considerados importantes fatores de virulência nas infecções estafilocócicas no homem e nos animais (NOVICK et al., 2001).

INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCOCICA

As enterotoxinas produzidas e liberadas pelos estafilococos durante sua multiplicação nos alimentos são termoestáveis (SILVA JÚNIOR, 1997), o que indica que a temperatura de cozimento dos alimentos não interfere na atividade biológica das SEs, possibilitando a instalação de quadros de intoxicação alimentar no homem. Giletto e Fyffe (1998) assinalaram que as intoxicações estafilocócicas afetam 1,2 milhões de pessoas anualmente, resultando numa perda econômica de 1,5 bilhões de dólares.

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Pode resultar em desidratação decorrente

da perda significativa de líquido, sudorese e cefaléia, geralmente não acompanhada de estado febril. Os sintomas começam a manifestar-se aproximadamente quatro horas após o consumo do alimento contaminado (MURRAY et al., 1992). A pele e a mucosa do homem atuam como reservatórios de estafilococos, resultando em importante fonte de veiculação destes microrganismos para os alimentos (RAPINI et al., 2004). Nos animais domésticos, *S. aureus* é considerado o principal agente das infecções em glândula mamária (LIM et al., 2004).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas. Estima-se que de 100ng a 1µg são eficientes para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (BERGDOLL, 1990). Para que ocorra a produção mínima de enterotoxina estafilocócica no alimento é necessário que haja condições adequadas de temperatura e pH para a multiplicação dos estafilococos, até contagens de 10^5 UFC/g de alimento (MOSSEL e GARCIA, 1975). No entanto, Carmo e Bergdoll (1990) e Cunha Neto et al. (1999) detectaram enterotoxinas estafilocócicas em alimentos com níveis de contaminação estafilocócica entre 10^4 a 10^8 UFC/g e 10^2 a 10^4 UFC/g, respectivamente.

Em surtos de Enfermidades Transmissíveis por Alimentos (ETAs) investigados pelos laboratórios de saúde pública do Estado de São Paulo, entre 1994 e 1998, Gelli et al. (1999) verificaram que das amostras analisadas em 776 surtos o agente causal foi identificado em 400 deles, dos quais *S. aureus* foi o mais prevalente (43,7%), demonstrando sua importância para a saúde pública.

Estudos epidemiológicos sobre toxinfecções alimentares envolvendo leite e derivados no Estado de Minas Gerais, no período entre 1997 e 2002, revelaram que dentre os produtos lácteos envolvidos nos surtos, o queijo ocupava lugar de destaque e *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. sciuri* e *S. lugdunensis* foram as espécies de *Staphylococcus* mais prevalentes, das quais

foram detectadas as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 (VERAS et al., 2003).

Um dos principais indicadores de enterotoxigenicidade de estafilococos é o teste da coagulase. Contudo, alguns autores isolaram estafilococos coagulase negativa enterotoxigênicos das mãos de manipuladores de alimentos, do leite e derivados (UDO et al., 1999; SENA, 2000). Estes resultados trazem reflexos importantes para a saúde pública, visto que a legislação brasileira não especifica padrões para estes microrganismos, restringindo-se apenas, a descrever valores para espécies coagulase positivas (SENA, 2000).

ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (SEs)

As enterotoxinas são produzidas predominantemente por *S. aureus*. No entanto, outras espécies coagulase-positivas, incluindo *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*, têm sido apontadas como enterotoxigênicas (SENA, 2000), bem como espécies coagulase negativas (RAPINI et al., 2003). Estas toxinas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais. A termo-estabilidade é observada pela viabilidade após aquecimento à 100°C durante 30 minutos (MURRAY et al., 1992) e as temperaturas de pasteurização lenta e rápida (FRANCO e LANDGRAFF, 2000). Isto pressupõe que as atividades biológicas das enterotoxinas estafilocócicas permanecem inalteradas, mesmo após o processamento térmico usual dos alimentos (HOLECKOVÁ et al., 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem à família denominada de toxinas pirogênicas (PT), originada de espécies de estafilococos e estreptococos. Nesta família também são incluídas a TSST-1, a toxina esfoliativa tipos A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE) que apresentam determinadas estruturas, funções e seqüências de nucleotídeos similares (BALABAN e RASOOLY, 2000). Causam imunossupressão e a proliferação

inespecífica de células T que são atividades atribuídas aos superantígenos (LOIR et al., 2003). Porém, entre estes, apenas SEs têm atividade emética (DINGES et al., 2000).

As enterotoxinas têm sido classificadas em cinco tipos sorológicos SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Porém novas enterotoxinas já foram descritas na literatura, incluindo SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL, SEM, SEN, SEO, SEU (REN et al., 1994; SU e WONG, 1995; MUNSON et al., 1998; ZHANG et al., 1998; JAURRAD et al., 2001; ORWIN et al., 2001, 2003; LETERTRE et al., 2003). A relação entre essas novas enterotoxinas e intoxicações alimentares ainda não está totalmente esclarecida (OMOE et al., 2002), exceto para SEG, SEH e SEI (MCLAUCHLIN et al., 2000).

SÍNDROME ESTAFILOCÓCICA DA PELE ESCALDADA

A síndrome estafilocócica da pele escaldada (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome - SSSS) é o termo utilizado para uma coleção de doenças bolhosas da pele, induzida por toxinas esfoliativas (ETs) de *S. aureus*. Primariamente, afeta neonatos e crianças, embora adultos com infecções latentes também sejam susceptíveis (LADHANI et al., 2001).

Clinicamente apresenta-se de forma abrupta, com febre, sensibilidade da pele, eritema e descamação da epiderme (YAMAGUCHI et al., 2002), revelando uma superfície úmida e brilhante com aparência semelhante à pele escaldada (ARBUTHNOTT et al., 1990).

Sorologicamente, dois tipos da toxina denominadas ETA e ETB eram reconhecidas (JOHNSON et al., 1991). A toxina ETA codificada por gene cromossomal e ETB por gene plasmidial (LEE et al., 1987). Posteriormente, Sato et al. (1994) verificaram um novo tipo de toxina esfoliativa, denominada ETC, a partir de estirpes de *S. aureus* isolados de cavalo com infecções cutâneas. Recentemente, Yamaguchi et al. (2002) identificaram numa ilha de patogenicidade

em isolados clínicos de *S. aureus* a sequência do gene de uma nova toxina esfoliativa, a ETD.

As toxinas esfoliativas apresentam os seguintes pesos moleculares: ETA 26,9 KDa, ETB 27,2 KDa (LEE et al., 1987; SATO et al., 1994), ETC 27,0 KDa (SATO et al., 1994) e ETD 27,2 KDa (YAMAGUCHI et al., 2002). A atividade da ETA é estável, mesmo após aquecimento a 100°C por 20 minutos, ao contrário da ETB e ETC, que são sensíveis ao aquecimento de 60°C por 15 a 30 minutos (SATO et al., 1994). A elevada termo-resistência da ETA gera reflexos em saúde pública, visto que esta toxina poderia induzir afecções cutâneas no homem, mesmo após tratamentos convencionais dos alimentos.

Além da toxina esfoliativa estar relacionada a lesões na pele, e sua produção ser legada a linhagens de *S. aureus* isoladas de humanos clinicamente acometidos (MEHROTRA et al., 2000), sua presença em amostras de leite já foi demonstrada por Endo et al. (2003) que detectaram o gene eta e a toxina ETA de isolados de leite de vacas com mastite.

SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO ESTAFILOCÓCICO

A síndrome do Choque Tóxico (TSS) é uma doença aguda mediada por toxinas (HERZER et al., 2001). Clinicamente é caracterizada por febre, rachaduras cutâneas, descamação particularmente dos pés e palmas das mãos, hipotensão e envolvimento multiorgânico (DINGES et al., 2000). A maior ocorrência da doença está relacionada a mulheres jovens em período menstrual. Porém, quando começaram a surgir casos em mulheres não menstruadas e homens, tornou-se evidente que esta síndrome poderia atingir qualquer grupo da população. Para que ocorra TSS é necessário que o paciente esteja infectado por *S. aureus* e que esta linhagem produza TSST-1 e consiga atingir a circulação (HERZER et al., 2001).

A proteína TSST-1 foi estudada por

Bergdoll et al. (1981) como uma enterotoxina (denominada inicialmente de SEF), considerada originalmente como um problema em alimentos. No entanto, Thompson et al. (1986) relataram que não havia evidências para fundamentar esta possibilidade. Posteriormente, outros autores observaram a presença de TSST-1 em alimentos e isolados de leite de animais com mastite, geralmente associada a SEs, principalmente SEA, SEC e SED (HO et al., 1989; CARDOSO et al., 2000).

TOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E A GLÂNDULA MAMÁRIA

Nos animais domésticos, o *S. aureus* é considerado o principal agente de infecções da glândula mamária (LIM et al., 2004). No Brasil, Silva et al. (2005) analisando 36 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite caprina e 64 de mastite bovina verificaram a presença de genes das SEs em 37 (37%) dos isolados, dos quais seis eram de origem bovina e 31 de origem caprina, concluindo que os isolados de mastite caprina têm maior poder de enterotoxigenicidade e que a presença do gene sec na maioria dos isolados sugere um possível envolvimento da SEC na patogênese das mastites caprinas.

Entre as enterotoxinas clássicas SEA-SEE e a TSST-1, tem relevância nos casos de mastite bovina, as linhagens de *S. aureus* que apresentam os genes para as toxinas SEC e TSST-1, pois estas são as estirpes associadas com severos casos de mastite clínica ou casos que não respondem à terapia com antibióticos (ZSCHÖCK et al., 2004).

A associação dos genes sec e tst em linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina também foi observada por Salasia et al. (2004) na Alemanha havendo, segundo estes autores, uma variação geográfica de linhagens de *S. aureus* enterotóxicas.

Em amostras de leite de vacas com mastite, o genótipo mais freqüente é aquele portador dos genes seg e sei (OMOE et

al., 2002; LONCAREVICK et al., 2005).

Cabral et al. (2004) pesquisaram a presença de genes para as SEs em 87 linhagens de *S. aureus* provenientes do Brasil e obtidas de leite de vacas com mastite, porém não encontraram os genes para as toxinas clássicas SEA-SEE, detectando apenas a presença dos genes para as toxinas SEG, SEH e SEI que são mais recentes. Segundo os mesmos autores, a presença de genes para estas novas toxinas não é importante no estabelecimento e disseminação das mastites. No entanto, segundo Katsuda et al. (2005), o papel dessas novas toxinas na patogenicidade dos isolados de *S. aureus* em afetar a glândula mamária não está elucidada. Porém, o predomínio destas estirpes portadoras de genes para novas SEs fortalece a teoria de que essas toxinas superantigênicas são importantes nas afecções da glândula mamária.

ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS: ASPECTOS GENÉTICOS E DETECÇÃO

Diferentes genes codificadores de enterotoxinas já foram estudados e suas denominações iniciam com as letras se (de enterotoxina estafilocócica) ou ent (de enterotoxina), das quais a primeira forma é a mais utilizada na atualidade. Estes genes são carregados por plasmídeos - sed e sej (BAYLES e IANDOLO, 1989; ZHANG et al., 1998), por fagos - sea e see (BETLEY e MEKALANOS, 1985), ou por cromossomos - seb, sec, seg, seh, sei, sek, sel, sem, sen, seo, sep e seq (LETERTRE et al., 2003).

A SEA é expressa na metade da fase exponencial da multiplicação dos estafilococos (TREMAINE et al., 1993). A detecção do gene sea em linhagens de *S. aureus* é importante visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988). O gene sea é composto por 771 pb e codifica proteína precursora da SEA com 257 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 27,1 KDa (BETLEY e MEKALANOS, 1988).

De acordo com Holecková et al. (2002),

SEB foi a principal enterotoxina produzida por *Staphylococcus* sp isolados de queijos fabricados com leite de ovelha. O gene (*seb*) consiste de 798 nucleotídeos que codifica uma proteína com 266 aminoácidos e peso molecular de 31,4 KDa (JOHNS e KHAN, 1988).

De um total de 39 SECs produzidas por estirpes de *S. aureus* responsáveis por 20 surtos de intoxicação alimentar no centro de Taiwan, 12 SECs pertenciam ao subtipo SEC₂ e 13 ao subtipo SEC₃. Apenas uma linhagem pertencia ao subtipo SEC₁ e 13 a outros subtipos de SECs. Isso demonstra que SEC₂ e SEC₃ são os subtipos de SECs mais freqüentes em surtos de intoxicação alimentar (CHEN et al., 2001).

Estudando 100 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite nos estados do Ceará e Rio de Janeiro, das quais 36 de origem bovina e 64 de origem caprina, Silva et al. (2005) observaram a presença do gene *sec* em 2 (3,1%) dos isolados bovinos e em 31 (86%) dos isolados caprinos. Segundo Wilson et al. (1991), as SECs estão comumente associadas ao leite e produtos derivados provenientes de bovinos, ovinos e caprinos.

O gene *sec*₁ contém 801 pb e codifica uma proteína madura com 239 aminoácidos e 27,4 KDa (BOHACH e SCHLIEVERT, 1987). O gene *sec*₂ contém 801 pb e codifica uma proteína madura com 239 aminoácidos e 26,0 KDa (BOHACH e SCHLIEVERT, 1989). O gene *sec*₃ contém 798 bp e codifica uma proteína madura com 238 aa e 27,4 KDa (COUCH e BETLEY, 1989).

De acordo com Casman et al. (1967), SED é comumente produzida por estirpes de *Staphylococcus* isoladas de leite e alimentos congelados, enquadrando-se como a segunda SEs mais encontrada, depois de SEA, em intoxicações alimentares. A baixa produção de SED é significativa, pois pouca quantidade de enterotoxina (100 a 200 ng) é necessária para causar doença, especialmente em crianças e idosos (KOKAN e BERGDOLL, 1987). O gene *sed* foi localizado no plasmídeo da penicilinase de 27,6

kb e codifica uma proteína madura com 228 aminoácidos, com peso molecular de 26,3 KDa (BAYLES e IANDOLO, 1989).

O gene para SEE (*see*) codifica uma proteína de 29 KDa (COUCH et al., 1988) que apresenta homologia com SEA e SED (BALABAN e RASOOLY, 2000).

Dois novos genes de enterotoxinas estafilocócicas foram identificados e designados *seg* e *sei*, codificando proteínas precursoras de 258 aminoácidos (SEG) e 242 aminoácidos (SEI) e proteínas maduras de 27,0 KDa (SEG) e 24,9 KDa (SEI), ambas com a propriedade de proliferação de células T e ação emética (MUNSON et al., 1998). Os genes *seg* e *sei* estão presentes em *S. aureus* em um mesmo fragmento de DNA com 3,2 Kb, orientados em tandem (JAURRAD et al., 1999). No mesmo estudo foi verificado que em 12 linhagens de *S. aureus* isoladas de pacientes com TSS e SSSS, não foram observadas a produção de TSST-1, SEA-SEE, ETA ou ETB. Porém, utilizando primers específicos para *seg* e *sei*, ambos os genes foram detectados em todas as amostras, demonstrando que SEG e SEI estão associadas com as síndromes do choque tóxico e a da pele escaldada.

Omoe et al. (2002) pesquisaram a presença de genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea* a *sei*) em 146 estirpes de *S. aureus*, 71 destas provenientes de humanos envolvidos em 25 surtos de intoxicações alimentares, 18 de humanos sadios, 21 de vacas com mastite e 36 de leite de vaca. Verificaram também que 113 (77,4%) dos isolados foram positivos para um ou mais genes de SEs, e 35 linhagens portavam *seg* e 32 *sei*.

Ren et al. (1994) purificaram SEH de uma estirpe clínica de *S. aureus* de um paciente com TSS não associada ao período menstrual que foi negativa para TSST-1. Su e Wong (1996) desenvolveram um ELISA para SEH e observaram que uma amostra envolvida em intoxicação alimentar produziu SEH, demonstrando que esta toxina é capaz de causar intoxicação alimentar e sintomas de TSS. Seu peso molecular é de 27,3 KDa e seu ponto isoelétrico de 5,7

que é considerado ácido, diferentemente das demais SEs conhecidas que possuem pH neutro ou básico com pontos isoelétricos variando de 7,0 a 8,6 (SU e WONG, 1995).

A caracterização do plasmídeo portador o gene responsável pela codificação da enterotoxina D revelou a presença de uma ORF (Open Reading Frame – seqüência aberta de leitura) a qual codifica uma enterotoxina com 268 aminoácidos e 31,2 KDa previamente não identificada, designada enterotoxina estafilocócica J (SEJ). As ORF de sed e sej são orientadas em direções opostas no plasmídeo (pBI485) e são separadas por 895 nucleotídeos (ZHANG et al., 1998).

A SEK tem um peso molecular de 26,0 KDa e é codificada pelo gene sek contido em uma ilha de patogenicidade estafilocócica (SaPI), que também contém o gene seb para a SEB (ORWIN et al., 2001).

O gene responsável pelas SEM, SEN e SEO pode ser carregado pelos isolados de *S. aureus* portando os genes seg e sei. No entanto, SEL, SEM, SEN e SEO não têm demonstrado atividades eméticas em modelos animais, mas em caso de elevada produção de SEG e SEI poderiam causar intoxicações (OMOE et al., 2002).

A presença do gene seu codificador da enterotoxina estafilocócica denominada SEU foi descrita por LETERTRE et al. (2003) em um cluster egc de *Staphylococcus aureus*.

O desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e eficazes para a detecção de patógenos de origem alimentar tem recebido maior atenção nos últimos anos devido a preocupação com a saúde pública e maior conscientização dos riscos de contaminação microbiológica de alimentos (RAMESH et al. 2002).

A caracterização das SEs tem sido dificultada por fatores como baixos níveis de produção da toxina, dificuldades associadas com a purificação e a falta de métodos simples e rápidos para suas detecções (SU e WONG, 1995).

Devido às informações sobre a se-

qüência de DNA das SEs (REN et al., 1994; SU e WONG, 1995, 1997; MCLAUCHLIN et al., 2000), a PCR torna-se um método alternativo para a detecção dos genes destas toxinas (BECKER et al., 1998), mostrando-se uma técnica simples e reprodutível, funcionando como uma ferramenta genética para estudos epidemiológicos.

De um total de 176 estirpes de *Staphylococcus* isoladas de alimentos em Taiwan, 64 foram positivas para enterotoxinas através do Kit SET-RPLA e 72 pela PCR (TSEN et al., 1995), demonstrando a alta eficiência da técnica molecular. No mesmo estudo foi observado que a PCR permite a detecção específica do gene de algumas toxinas, como o da toxina E que não é detectada pela RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination).

A utilização da PCR na identificação de genes de SEs em isolados de *S. aureus* é uma alternativa de baixo custo em relação a alguns métodos imunológicos (JOHNSON et al., 1991; MCLAUCHLIN et al., 2000).

Entre os testes imunológicos o ELISA é tão eficiente e sensível quanto RIA e não necessita do uso de material radioativo (MORISSETTE et al., 1991). Gómez-Lucía et al. (1989) verificaram que a imunodifusão não é um bom método para a determinação de enterotoxinas em alimentos, pois os diferentes componentes podem inibir ou realçar sua síntese. Outros estudos relatam ótima concordância entre métodos genéticos (hibridização, PCR) e métodos imunológicos (RIA, Imunodifusão em gel, ELISA, RPLA) na detecção de exotoxinas estafilocócicas (MCLAUCHLIN et al., 2000; HOLECKOVÁ et al., 2002).

Atualmente, em laboratórios de referência, os métodos mais utilizados são o ELISA na indústria de alimentos e o PCR em estudos epidemiológicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notória a importância do *Staphylococcus aureus* para a Saúde Pública, principalmente no que se refere às suas exotoxinas. Muito já foi estudado sobre este mi-

crorganismo e seus fatores de patogenicidade, porém mais pesquisas ainda devem ser realizadas para se compreender melhor o envolvimento desta bactéria na etiologia de várias doenças, para a prevenção das intoxicações alimentares e incremento no diagnóstico das exotoxinas reconhecidas e de outras toxinas do agente, otimizando o uso da biologia molecular que nos últimos anos tem trazido grande contribuição ao estudo deste microrganismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; DE AZEVEDO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. In: *The Staphylococci: an introduction*. The Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 69, n.19, p.101-107, 1990.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 61, p. 01-10, 2000.
- BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analices of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 171, p. 4799-4806, 1989.
- BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.36, p. 2548-2553, 1998.
- BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F. et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with the toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*, Oxford, p. 1017-1021, 1981.
- BERGDOLL, B.M. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 10, p. 91-100, 1990.
- BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, Washington, v. 229, p. 185-187, 1985.
- BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.170, p. 34-41, 1988.
- BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Molecular and General Genetics*, Oakland, v. 209, p. 15-20, 1987.
- BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Conservation of the Biologically Active Portions of Staphylococcal Enterotoxins C1 and C2. *Infection and immunity*, Washington, v. 57, n. 7, p. 2249-2252, 1989.
- CABRAL, K. G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. et al. Pheno and genotyping *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, Canada, v. 50, p. 901-909, 2004.
- CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 320-323, 1990.
- CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, London, v. 14, p. 09-14, 2002.
- CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N.A. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 52, p. 7-10, 2000.
- CASMAN, E.P.; BENNETT, E.P.; DORSEY, A.E. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 94, n. 6, p.1875-1882, 1967.
- CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S. et al. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 71, p. 63-70, 2001.

- COUCH, J.L.; SOLTIS, M.T.; BETLEY, M.J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 170, p. 2954-2960, 1988.
- COUCH, J.L.; BETLEY, M.J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 171, p. 4507-4510, 1989.
- CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 1999. 65p.
- DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.
- ENDO, Y.; YAMADA, T.; MATSUNAGA, K. et al. Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 96, p. 81-90, 2003.
- EVENSON, M.L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R.S. et al. Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 7, p. 311-316, 1988.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAFF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2000, 182p.
- GELLI, D.S.; JACABI, M.; SAKUMA, H. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) investigados pelos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, no período de 1994 a 1998. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., Salvador. Anais... Salvador: [s. n.], 1999. p. 126.
- GILETTO, A.; FYFFE, J. G. A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of Staphylococcal enterotoxin A. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Bunkyo-ku, v. 62, n. 11, p. 2217-2222, 1998.
- GOMEZ-LUCÍA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A. et al. Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 55, n. 6, p. 1447-1451, 1989.
- HERZER, C.M. Toxic Shock Syndrome: Broadening the Differential Diagnosis. *The Journal of American Board of Family Practice*, Lexington, v.14, n. 2, p. 131-136, 2001.
- HO, G.; CAMPBELL, W.H.; BERGDOLL, M.S. et al. Production of toxic shock syndrome toxin variant by *Staphylococcus aureus* associated with sheep, goats, and cows. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.27, n. 9, p. 1946-1948, 1989.
- HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Lublin, v. 9, p. 179-182, 2002.
- JAURRAD, S; COZON, G.; VANDENESCH, F. et al. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 37, p. 2446-2449, 1999.
- JAURRAD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A. et al. egc a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*, Rockville Pike, v. 166, p. 669-677, 2001.
- JOHNS JR., M.B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 170, p. 4033-4039, 1988.
- JOHNSON, W.M.S.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.
- KATSUDA, K.; HATA, E.; KOBAYASHI, H. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 105, p. 301-305, 2005.

- KOKAN, N.P.; BERGDOLL, M.S.. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 53, n. 11, p. 2675-2676, 1987.
- KONEMAN, F.W.; ALLEN S.D.; JANDA, S.P.C. et al. *Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados*, pp.551-588. In: KONEMAN, F.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, P.C. et al. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5ª Edição*. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465p.
- LADHANI, S.; JOANNOU, C. L.; LOCHRIE, D.P. et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 12, n. 2, p. 224-242, 1999.
- LADHANI, S.; ROBBIE, S.; GARRATT, R.C. et al. Development and evaluation of detection system for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 6, p.: 2050-2054, 2001.
- LEE, C.Y.; SCHMIDT, J.J.; JOHNSON-WINEGAR, A.D. et al. Sequence determination and comparison of exfoliative toxin A and B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 169, p. 3901-3909, 1987.
- LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 2, p. 63-76, 2003.
- LIM, S.K.; JOO, Y.; MOON, J. et al. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*, Tokyo, v. 66, n. 5, p. 581-584, 2004.
- LOIR, Y.L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 2, p. 63-76, 2003.
- LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A. et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology*, United Kingdom, v. 98, p. 344-350, 2005.
- MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.
- MEHOTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.
- MORISSETTE, C.; GOULET, J.; LAMOUREX, G. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, n. 3, p. 836-842, 1991.
- MOSSEL, D.A.A.; GARCIA, M.B. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 1ª Edição*. Zaragoza: Acribia, 1975, 375p.
- MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G. et al. *Microbiologia Médica. 3ª Edição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 513p.
- MUSON, S.H.; TREIMANE, M.T.; BETELEY, M.J. et al. Identification and characterization of *Staphylococcus enterotoxin* type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 66, p. 3337-3348, 1998.
- NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and Resistance Islands of *Staphylococci*. *Microbes and Infection*, Amsterdam, v. 3, p. 585-94, 2001.
- OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* ou *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, n.3, p. 857-862, 2002.

- ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; HEATHER, L.D. et al. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. *Infection and Immunity*, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 360-366, 2001.
- ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M. et al. Characterization of Staphylococcus aureus Enterotoxin L. *Infection and Immunity*, Amsterdam, v. 71, n. 5, p. 2916-2919, 2003.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A. et al. Application of convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of Staphylococcus aureus and Yersinia enterocolitica in milk samples. *Molecular and Cellular Probes*, Oxford, v. 16, p. 307-14, 2002.
- RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de Staphylococcus sp. enterotoxigênicos isoladas de queijo tipo coalho. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p.161, 2003.
- RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de Staphylococcus sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.
- REN, K; BANNAN, J.D.; PANCHOLI, V. et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 180, p. 1675-1683, 1994.
- SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÄMMLER, C. et al. Comparative studies on phenotypic and genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science*, Korea, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.
- SATO, H.; MATSUMORI, Y.; TANABE, T. et al. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a Staphylococcus aureus strain isolated from a horse with phlegmon. *Infection and Immunity*, Amsterdam, v. 62, n. 9, p. 3780-3785, 1994.
- SENA, M.J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000, 75p.
- SILVA JR. E.A. Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos. São Paulo: Varela, 1997, 385p.
- SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in Staphylococcus aureus from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.
- SPICER W.J. Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 224p.
- SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, p. 1438-1443, 1995.
- SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 59, n. 3, p. 327-330, 1996.
- SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 60, p. 195-202, 1997.
- THOMPSON, N.E.; GOMEZ-LUCIA, E.; BERGDOLL, M.S. Incidente of antibodies reactive with toxic shock síndrome toxin 1 in bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 51, n. 4, p. 865-867, 1986.
- TORTORA, J.G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 6ª Edição. São Paulo: Artmed, 2002, 827p.
- TREIMANE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene (agr). *Infection and Immunity*, Washington, v. 61, p. 356-359, 1993.
- TSEN, H.; YU, G.; LIN, I. Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 58, n. 2, p. 147-153, 1995.

- UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *Journal of Medical Microbiology*, Spencers woods, v. 48, p. 819-823, 1999.
- VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, p. 218, 2003.
- WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and thermonuclease gene nuc. *Applied of Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, n.6, p. 1793-1798, 1991.
- YAMAGUCHI, T.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, M. et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity*, Washington, v. 70, n. 10, p. 5835-5845, 2002.
- ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of sec/tst-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Letters in Applied Microbiology*, United Kingdom, v. 38, p. 493-498, 2004.
- ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 168, p. 227-233, 1998.