

M

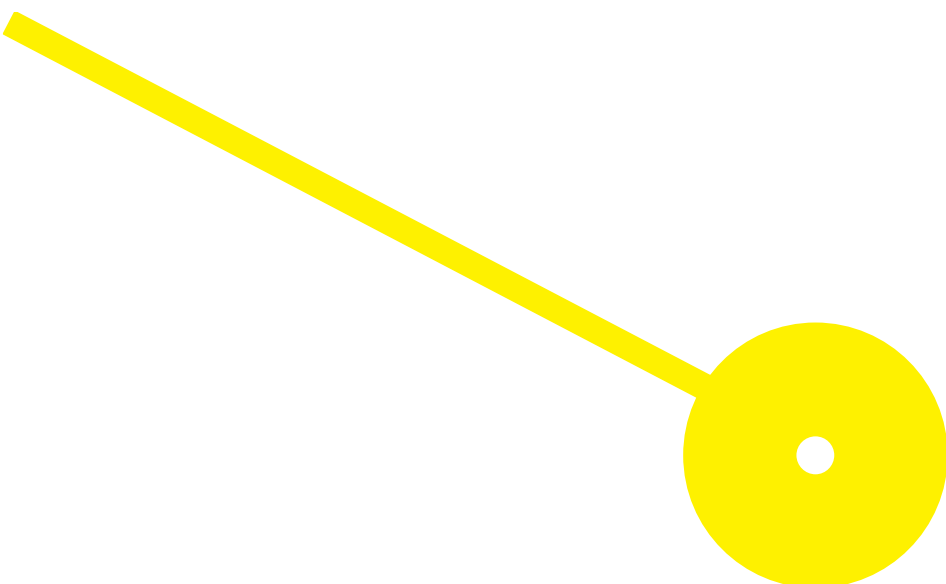
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA
RAMO MICROBIOLOGÍA E SAÚDE PÚBLICA

Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por método de ELISA

Andreína Raquel Soares Pereira

09/2020





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

**Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por método de
ELISA**

Autor

Andreína Raquel Soares Pereira

Orientadores

Doutor Ricardo Jorge Afonso Costa Magalhães. Professor associado da Universidade
Fernando Pessoa

Especialista Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa. Professor Adjunto do Politécnico do
Porto, Escola Superior De Saúde

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises
Clínicas e Saúde Pública – Ramo Microbiologia e Saúde
Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto
Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com a colaboração, directa ou indirecta, de um conjunto amplo de familiares e amigos, aos quais gostaria de agradecer.

Um agradecimento ao laboratório Biogerm por todo o apoio técnico prestado para a execução deste trabalho.

Um agradecimento especial ao meu marido Daniel Marcano Zamora, pelo apoio, disponibilidade e entusiasmo que demonstrou na minha tese de Mestrado e pelo acompanhamento durante todo este caminho.

Mais que agradecimento fica este trabalho dedicado ao meu filho Alejandro Augusto Marcano de Jesús como demonstração de que com esforço e dedicação podemos conseguir tudo o que quisermos.

Resumo

Os *Staphylococcus aureus* são agentes causais de intoxicação alimentar, e o método de ELISA é dos procedimentos mais utilizados para a detecção de toxinas de *S. aureus*. Nesta investigação foi feita a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por método de ELISA (RIDASCREEN SET) em 282 amostras associadas a possíveis intoxicações alimentares entre 2019–2020. Das 282 amostras testadas 0,35% apresentou resultado positivo para cultura de *S. aureus*, e do total de amostras testadas 0,71% apresentaram resultados positivos para enterotoxinas; as amostras positivas para enterotoxinas foram negativas por cultura para os microrganismos investigados. Os resultados deste estudo demonstram a importância da investigação de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos com possíveis relações com intoxicações alimentares, sem se restringir àqueles com contagens elevadas de *S. aureus*. É importante expandir a investigação para outras matrizes alimentares, uma vez que atualmente existem muitas refeições onde os alimentos são colocados com pouco cozimento e as enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes não sendo facilmente detectadas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; RIDASCREEN SET; enterotoxinas; alimentos.

Abstract

Staphylococcus aureus is a causal agents of food poisoning, and the ELISA method is one of the most used procedures for the detection of *S. aureus* toxins. In this investigation, the detection of staphylococcal enterotoxins in food matrices by ELISA method (RIDASCREEN SET) was performed on 282 samples associated with possible food poisoning between 2019–2020. Of the 282 samples tested, 0.35% showed a positive result for culture of *S. aureus*, and of the total of tested samples 0.71% showed positive results for enterotoxins; samples positive for enterotoxins were culture negative for the investigated microorganisms. The results of this study demonstrate the importance of investigating staphylococcal enterotoxins in foods with possible links to food poisoning, without being restricted to those with high *S. aureus* counts. It is important to expand the research to other food matrices, since there are currently many meals where foods are placed with little cooking and staphylococcal enterotoxins may be present and are not easily detected.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; RIDASCREEN SET; enterotoxins; food.

Índice

Índice de abreviaturas.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Doenças transmitidas por alimentos.....	1
1.2. Infecções alimentares de origem bacteriana.....	2
1.3. Intoxicações alimentares de origem bacteriana.....	2
1.3.1. <i>Bacillus cereus</i>	2
1.3.2. <i>Clostridium botulinum</i>	3
1.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.4. Toxinas.....	7
1.5. Toxinas microbianas.....	7
1.5.1. Endotoxinas.....	7
1.5.2. Exotoxinas.....	7
1.5.2.1. Neurotoxinas.....	7
1.5.2.2. Cardiotoxinas.....	8
1.5.2.3. Hepatotoxinas.....	8
1.5.2.4. Enterotoxinas.....	8
1.6. Métodos de detecção de toxinas.....	9
1.6.1. Métodos imunológicos clássicos.....	9
1.6.1.1. Imunodifusão.....	10
1.6.1.2. Radioimunoensaio.....	10
1.6.1.3. Aglutinação em latex.....	10
1.6.1.4. ELISA.....	10
1.6.2. Kits imunológicos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.....	11
1.6.2.1. VIDAS SET.....	11
1.6.2.2. TRANSIA PLATE.....	11
1.6.2.3. RIDASCREEN SET.....	12
1.6.3. Métodos moleculares.....	13
1.7. Objetivo Geral do estudo.....	13
1.7.1. Objetivos específicos.....	13
2. Métodos.....	13
2.1. Materiais.....	13
2.1.1. Reagentes.....	13

2.1.1. Amostras	14
2.1.2. Equipamentos	14
2.2. Procedimento	15
2.2.1. Cultura de patógenos alimentares.....	15
2.2.2. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por método Ridascreen.	15
3. Resultados	17
3.1. Pesquisa de patógenos alimentares em matrizes alimentares por método de cultura.....	17
3.2. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares.....	18
3.2.1 Controlo de qualidade fase de extração por concentração com membrana de diálises.	18
3.2.2. Controlo de qualidade do Kit Ridascreem SET	19
4. Discussão.....	20
5. Conclusão.....	21
6. Referencias	22

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
APC	Alimentos prontos para consumo
BHI	Infusão cérebro-coração
CE	Conformidade Europeia
CPS	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos
ELFA	Ensaio de fluorescência ligado à enzima
ERIC-PCR	PCR de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano
LSP	Lipopolisacarídeos
MLST	Tipagem por sequenciação de múltiplos loci
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
PFGE	Electroforese em gel de campo pulsado
RAPD	Amplificação aleatória de ADN polimórfico
RFS	Recipiente de fase sólida
SAGs	Superantígenos estafilocócicos
SaPIs	Ilhas de patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i>
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
ST	Tipos de sequência
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico

1. Introdução

A intoxicação alimentar ocorre como um resultado da ingestão de toxinas bacterianas pré-formadas no alimento: células bacterianas vivas não precisam estar presentes para a intoxicação se desenvolver.

Staphylococcus aureus, em particular as estirpes enterotoxigénicas, é um patógeno bem conhecido na microbiologia de alimentos como uma das causas mais comuns de intoxicação alimentar. O género *Staphylococcus* é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções alimentares no mundo (Cunha Neto et al., 2002). Algumas estirpes de *Staphylococcus aureus* produzem uma grande variedade de exoproteínas capazes de provocar intoxicações, a partir da ingestão da toxina pré-formada nos alimentos (Dinges et al., 2000; Veras et al., 2008); assim, a detecção das enterotoxinas estafilocócicas é importante na qualidade e segurança dos alimentos. É por esta razão que é vantajoso detectar enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por métodos rápidos, sensíveis e específicos assim como o ELISA em amostras associadas com toxinfecções alimentares.

1.1. Doenças transmitidas por alimentos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define intoxicação/ toxinfecção alimentar como aquela “de natureza infecciosa ou tóxica, causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados” (WHO, 2007). Há cerca de 250 tipos de toxinfecções alimentares, causadas em sua maioria por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas, além do envenenamento dos alimentos com toxinas naturais (cogumelos venenosos, toxina de peixes e algas) ou produtos químicos (metais e agrotóxicos). As intoxicações alimentares, apesar de frequentes, principalmente em alimentos de origem artesanal, são pouco notificadas em relação ao número de pessoas acometidas e aos agentes etiológicos. A maioria das toxinfecções alimentares é esporádica e muitas vezes subnotificadas, porém os surtos de origem alimentar podem assumir grandes proporções (Lawrynowicz-Paciorek et al., 2007). Água e alimentos são veículos de patógenos de substancial importância em saúde pública, incluindo os que causam doenças diarreicas agudas. As doenças de origem alimentar podem ter apresentações diferentes: a infecção alimentar resulta do crescimento de microorganismos nos intestinos após a ingestão de alimento por eles contaminado; na intoxicação alimentar não é necessária a ingestão do microorganismo, mas sim das toxinas produzidas por ele enquanto está no alimento, algumas das toxinas são destruídas pelo processamento mas outras continuam no alimento mesmo quando o microorganismo é eliminado; finalmente, na infecção mediada por toxinas poderá ocorrer a ingestão de um alimento que contenha microorganismos patogénicos, que produzem toxinas dentro dos intestinos.

1.2. Infecções alimentares de origem bacteriana

Entende-se por infecção alimentar a doença produzida por bactérias capazes de crescerem no interior do tracto gastrointestinal e de onde são capazes de invadir os tecidos ou os fluídos orgânicos do hospedeiro. As infecções manifestam-se pela invasão das mucosas, de cuja interacção se criam condições patológicas que resultam em doença. Os principais géneros bacterianos envolvidos neste mecanismo são *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Brucella*, *Clostridium*, *Campylobacter* e *Listeria* (Pinto, 1996)

1.3. Intoxicações alimentares de origem bacteriana

Por intoxicação alimentar entende-se o estado patológico provocado pela ingestão de alimentos contaminados por toxinas, produzidas por microrganismos, como resultado do seu crescimento nos alimentos. Estas três espécies bacterianas são considerados importantes causas de intoxicação alimentar. Estes são *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*, todas as quais são capazes de causar doença através da produção de toxinas nos alimentos. (Pinto, 1996)

1.3.1. *Bacillus cereus*

Esta espécie apresenta células em forma de bastonetes, móveis, esporulados, Gram positivos e anaeróbios facultativos. Produz tanto uma endotoxina, como uma exotoxina, dependendo da estirpe. As endotoxinas são complexos de lipopolissacarídeos, termolábeis, podendo ser destruídas a uma temperatura de 60^o C durante 20 minutos, enquanto as exotoxinas são de natureza polipeptídica, termorresistentes, exigindo para ser destruídas uma temperatura de 126^o C durante 90 minutos. Os seus habitats preferenciais são o ar, o solo, águas e diferentes alimentos de origem vegetal (cereais), lacticínios e produtos cárneos. (Pinto, 1996)

Bacillus cereus é amplamente distribuído em diferentes produtos alimentares e pode causar uma variedade dos sintomas associados à intoxicação alimentar. Os principais tipos de sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de vômitos, diarreias e dores abdominais. Os sintomas aparecem entre 1 a 5 horas após a ingestão do alimento contaminado. Como os alimentos prontos para consumo (APC) não são comumente esterilizados por tratamento térmico antes do consumo, contaminação por *B. cereus* pode causar problemas graves de segurança alimentar. Yu et al. (2020) investigaram a prevalência de *B. cereus* em amostras de alimentos APC de diferentes regiões da China e avaliaram os níveis contaminação bacteriana, resistência a antibióticos, distribuição de

genes de virulência e polimorfismos desses isolados. Dos alimentos APC testados, 35% foram positivos para *B. cereus*, com 39 e 83% das estirpes isoladas com genes codificantes para enterotoxinas *hbl*ACD e *nhe*ABC, respectivamente. O gene *ent*FM foi detectado em todas as estirpes de *B. cereus*. O gene *cytK* estava presente em 68% dos isolados, mas apenas 7% abrigavam o gene codificador da toxina emética CesB. O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou que a maioria dos isolados era resistente não apenas à maioria dos antibióticos β-lactâmicos, mas também à rifamicina. A tipagem por sequenciação de múltiplos loci (MLST) revelou que os 368 isolados pertenciam 192 tipos diferentes de sequência (STs), incluindo 93 novos STs, dos quais os mais prevalentes foi ST26. (Yu et al., 2020)

1.3.2. *Clostridium botulinum*

Esta espécie bacteriana apresenta as suas células em forma de bastonetes com 0,5 a 0,8 por 3 a 8 micrómetros, dispostos isoladamente, ou aos pares ou em cadeia, móveis por meio de flagelos peritricos, esporulados, Gram positivos e anaeróbios estritos. O *C. botulinum* é responsável pela doença conhecida pelo botulismo, intoxicação alimentar grave e, eventualmente, fatal, que afecta o Homem causando perturbações neuromusculares. Esta espécie produz potentes toxinas de elevado peso molecular e termorresistentes. Estas toxinas apenas são destruídas pelo aquecimento a 80º C, durante 30 minutos ou a 100º C, durante 10 minutos. Conhecem-se sete toxinas botulínicas diferentes, classificadas de A a G, de acordo com a sua natureza antigénica. Os alimentos mais sujeitos a serem contaminados pela produção destas toxinas são aqueles que sofrem alguns tratamentos térmicos com vista à sua conservação. Estão neste caso os alimentos enlatados, em conserva ou fumados, cujos tratamentos térmicos a que são sujeitos não permitem a destruição dos esporos do *C. botulinum*. Assim, os enlatados de vegetais e conservas de carnes elaborados em casa constituem os produtos alimentares de maior risco para a produção das toxinas botulínicas. Os principais sintomas caracterizam-se pela perda de visão, dificuldades respiratórias e debilidade por paralisia flácida. Estes sintomas manifestam-se entre 18 a 36 horas após a ingestão dos alimentos. Note-se que após o aparecimento dos primeiros sintomas poderá surgir a morte dentro de um dia. (Pinto, 1996)

1.3.3. *Staphylococcus aureus*

Esta espécie apresenta células de forma esférica, de 0,5 a 1,5 micrómetros de diâmetro, formando arranjos irregulares, imóveis, não esporulados, Gram positivos e anaeróbios facultativos. A sua presença nos alimentos pode provir dos próprios manipuladores de alimentos portadores de infecções piogénicas ou de portadores sãos que alojam estas bactérias no nariz, na garganta ou à

superfície das mãos. Produz uma exotoxina termorresistente, não afectada pela exposição a uma temperatura de 100º C, durante 30 minutos. Os alimentos mais susceptíveis à produção da toxina estafilocócica são os cremes deficientemente armazenados e refrigerados, carnes preparadas, sanduíches e mesmo leite, se incorrectamente refrigerado. Os principais sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia. Aparecem entre 2 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado. (Pinto, 1996)

Uma das doenças relacionadas a alimentos mais comuns é a intoxicação alimentar estafilocócica, resultante do consumo de alimentos que contêm quantidades suficientes de enterotoxinas estafilocócicas. Esta doença está associada a estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* que podem produzir uma ou mais enterotoxinas estáveis ao calor nos alimentos, causando vômitos e dor abdominal em humanos. Em 2015, 9,9% de todos os surtos europeus de intoxicações alimentares foram causados por enterotoxinas estafilocócicas, indicando a importância de planos de vigilância e publicação de relatórios atualizados para avaliações de avaliação de riscos. A pesquisa(?) de enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos é um critério microbiológico incluído no Regulamento da Comissão (CE) no 2073/2005. Até a presente data, 26 diferentes superantígenos estafilocócicos (SAGs) foram identificados, incluindo as enterotoxinas estafilocócicas relatadas como agentes responsáveis por surtos de origem alimentar; as toxinas estafilocócicas semelhantes a enterotoxina, que são um grupo de enterotoxinas estafilocócicas que não são eméticas num modelo de primata ou sua relação com intoxicação alimentar ainda não foi demonstrada experimentalmente; e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Vários estudos foram focados nos genes e nas bases moleculares das infecções, incluindo estudos de enterotoxinas eméticas recém-descobertas, outros fatores de virulência e propriedades superantigênicas de enterotoxinas estafilocócicas. Os genes que codificam para fatores de virulência em *S. aureus* são transportados por elementos genéticos móveis e consistem em profagos, plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (SaPIs) que codificam, entre outros, enterotoxinas e adesinas. Estes elementos genéticos móveis medeiam a sua própria transferência e integração em novos locais genómicos e, num fenómeno chamado de transferência horizontal de genes, também entre bactérias, permitem também evoluções adaptativas, como a transferência e aquisição de genes de resistência a antibióticos. (Macori et al., 2019)

Dehkordi et al. (2019) realizaram uma pesquisa sistemática utilizando bases de dados eletrônicos de artigos publicados por autores iranianos para extração e análise de dados. Em seu estudo, eles descobriram que a prevalência média combinada de *S. aureus* em recursos alimentares era de 15,5%, com a prevalência média estimada de estirpes enterotoxigênicas em 53,7%. A prevalência média de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em recursos contaminados foi

estimada em 15,5%. Os resultados mostraram que o SEA e o SEG foram os tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) mais prevalentes. Os resultados do padrão de resistência a antibióticos mostraram as maiores taxas de resistência a beta-lactâmicos, tetraciclina e eritromicina. Sua análise mostrou uma presença significativa de estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* e uma alta taxa de enterotoxinas estafilocócicas entre os recursos alimentares no Irã, e uma notável prevalência de estirpes de MRSA (Dehkordi et al., 2019).

O diagnóstico de intoxicação alimentar estafilocócica é geralmente confirmado por um dos seguintes resultados: (1) a recuperação de pelo menos 10^5 *S. aureus* / g de restos de alimentos; (2) a detecção de toxina estafilocócica em restos de alimentos; e / ou (3) o isolamento da mesma estirpe de *S. aureus* das amostras de pacientes e alimentos. Em alguns casos, a confirmação de intoxicação alimentar estafilocócica é difícil porque *S. aureus* é sensível ao calor, enquanto as toxinas estafilocócicas não. Assim, em matrizes alimentares tratadas termicamente, os *S. aureus* podem ser eliminados sem a toxina ser inativada: nesses casos, não é possível caracterizar um surto de intoxicação alimentar pela contagem de *S. aureus* em restos de alimentos (Hennekinne et al., 2010)

Mehramuz et al. (2020) avaliaram a contaminação microbiana no queijo Koozeh por ferramentas moleculares. Os autores identificaram *S. aureus* e suas enterotoxinas por testes bioquímicos e reação em cadeia da polimerase (PCR), e a tipagem molecular foi realizada pelo método de Amplificação aleatória de ADN polimórfico (RAPD). Um total de 42 amostras de queijo Koozeh de ovelhas e vacas foram coletadas em mercados aleatórios nas cidades e nas aldeias vizinhas. Eles descobriram que 71,42% das amostras estavam contaminadas com *Staphylococcus* spp. e em 50% dos isolados, o gene da coagulase específico de *S. aureus* *coa* foi detectado. Contaminação de alto nível foi observada em 7,14% das amostras. As enterotoxinas SEA ou SEB foram produzidas em 42,84% dos isolados. Nenhuma relação clonal foi observada por abordagem molecular. Os resultados obtidos indicam um alto nível de contaminação microbiana no queijo Koozeh, e a metade dos isolados era produtor de enterotoxina e apresentava alta diversidade e nenhuma relação clonal.

Machado et al (2019) descreveram as características microbiológicas e o perfil de genes que codificam enterotoxinas em 95 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos entre abril de 2011 e dezembro de 2014 de alimentos, pessoas e superfícies de lojas de alimentos. Após identificação microbiológica e teste de suscetibilidade antimicrobiana, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR), visando os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas clássicas A-E, e três genes adicionais: *seg*, *seh* e *sei*, codificando para as chamadas "novas enterotoxinas" G, H e I. Os isolados foram caracterizados por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), e cinco isolados selecionados foram posteriormente analisados por sequenciação

de múltiplos loci (MLST). Pode-se ressaltar que 54,7% dos isolados examinados abrigavam um ou mais dos tipos de genes SE investigados. A maioria dos isolados positivos carregava mais de um gene SE (até cinco tipos); *seg* foi o gene SE mais frequente, seguido por *sei*. Cinco isolados codificadores de enterotoxina também apresentavam alguns genes de resistência antimicrobiana; dois deles carregavam genes *erm* que expressavam resistência induzível à clindamicina. Os perfis de PFGE eram numerosos e diversos, mesmo entre as estirpes codificadoras de enterotoxina, porque a maioria dos isolados não pertencia a surtos conhecidos de origem alimentar e o período de amostragem foi longo. Os perfis de MLST também foram variados e um novo ST 3840 foi descrito nessa espécie. Os isolados codificadores de enterotoxina ST 88 e ST 72 foram identificados noutras regiões em associação com surtos de origem alimentar. Este estudo relata a primeira investigação sistemática de genes de enterotoxina em isolados de *S. aureus* obtidos de alimentos e pessoas infectadas no Uruguai (Machado et al., 2019).

Sivakumar et al. (2019) avaliaram os alimentos de rua como fonte de MRSA, para os quais 430 alimentos de rua de origem animal (carne, leite, ovos e seus produtos) e amostras ambientais associadas foram processadas para isolamento e caracterização. Foram isolados 52 *S. aureus* e observada resistência à oxacilina (36,5%), cefoxitina (25%) e penicilina G (82,7%) pelo teste de difusão em disco. Na triagem genotípica, *mecA* e *blaZ* foram detectados em 17,3% e 69,2% dos isolados, respectivamente. A tipagem de virulência identificou os genes *nuc*, *coa*, *clfA*, *spA*, *fnbA* e enterotoxina A (*sea*) em 100%, 96,2%, 30,8%, 55,8, 50% e 7,7% dos isolados, respectivamente. A diversidade genética entre os isolados foi observada por PCR de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR), que revelou 8 tipos / clados distintos entre os 52 isolados, com um valor de poder discriminatório (D) de 0,77. As semelhanças entre os perfis ERIC entre isolados de diversas fontes indicaram que as impressões digitais ERIC PCR foram eficazes na diferenciação dos isolados. (Sivakumar et al., 2019).

Cho et al. (2019) determinaram o perfil gênico de toxina, a produção de toxinas, o perfil de resistência a antibióticos e a diversidade genética de 42 isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos (CPS) recolhidos de 1.464 bolos recheados de creme na Coreia. Entre os isolados de CPS, 88,1% produziam genes de enterotoxina em combinação com outra toxina; 61,9% das estirpes foram positivas para o gene *sea*, 2,4% para o *sea-seb* e 9,5% para o *sea-sec*. Entre as estirpes que apresentaram resistência a antibióticos, 66,7% apresentaram resistência a apenas um antibiótico, enquanto 21,4% apresentaram resistência a múltiplos antibióticos: 9,5% das estirpes eram *mecA* positivas e resistentes à oxacilina. A maioria das estirpes é resistente a pelo menos um antibiótico. Os isolados de CPS foram classificados em oito serotipos de coagulase.

1.4. Toxinas

Uma toxina é uma substância venenosa produzida dentro de células ou organismos vivos. As toxinas podem ser pequenas moléculas, peptídeos, proteínas ou lipopolissacarídeos capazes de causar doenças em contato ou absorção por tecidos corporais que interagem com macromoléculas biológicas, como enzimas ou receptores celulares (Pinto, 1996).

1.5. Toxinas microbianas

As toxinas microbianas são toxinas produzidas por microrganismos, incluindo bactérias e fungos. As toxinas microbianas promovem infecções e doenças, danificando diretamente os tecidos do hospedeiro e desabilitando o sistema imunológico. Algumas toxinas bacterianas, como as neurotoxinas botulínicas, são as toxinas naturais mais potentes conhecidas. As bactérias geram toxinas que podem ser classificadas como exotoxinas ou endotoxinas (Pinto, 1996).

1.5.1. Endotoxinas

As endotoxinas, também chamadas toxinas intracelulares, são lipopolissacarídeos (LSP), constituintes das membranas das bactérias Gram-negativas. As endotoxinas LSP são constituídas por três componentes principais: lípido A, corpo polisacarídeo e antígeno O. As endotoxinas são menos potentes e menos específicas que a maioria das exotoxinas. Os sintomas associados à exposição a endotoxinas incluem febre, distúrbios intestinais e vômitos, entre outros (Pinto, 1996).

1.5.2. Exotoxinas

São proteínas e enzimas produzidas no interior de muitas bactérias Gram positivas ou Gram negativas como parte de seu crescimento e metabolismo, secretadas pela bactéria no meio circundante ou liberadas após a lise bacteriana, de considerável importância clínica. Devido à natureza enzimática da maioria das endotoxinas, até mesmo pequenas quantidades podem ser letais, pois podem ser usadas repetidamente, destruindo células do hospedeiro ou inibindo funções metabólicas. As doenças causadas por bactérias que produzem exotoxinas frequentemente são causadas por pequenas quantidades de exotoxinas capazes de produzir sinais e sintomas específicos da doença, e não pela bactéria em si. As exotoxinas são geradas e secretadas ativamente (Pinto, 1996).

1.5.2.1. Neurotoxinas

As neurotoxinas são um tipo extensivo de substâncias químicas exógenas neurológicas que são causadas por efeitos adversos na função do sistema nervoso. A atividade das neurotoxinas

pode ser caracterizada pela habilidade de inibir o controle neuronal sobre as concentrações de íons através da membrana celular ou a comunicação entre as neurônios através da sinapse. Um exemplo de neurotoxina bacteriana é a tetanospasmina, produzida por *Clostridium tetani*. A tetanospasmina é uma neurotoxina termolábil que bloqueia a liberação de neurotransmissores que inibem a contração muscular. Como consequência, ocorre uma contração contínua que leva à chamada contração tetânica. (Simpson, 1986).

1.5.2.2. Cardiotoxinas

Uma cardiotoxina é um glicosídeo venenoso com efeitos cardíacos específicos, por exemplo causa despolarização irreversível das membranas celulares. Alguns exemplos de cardiotoxinas bacterianas são a hemolisina direta termoestável do *Vibrio parahaemolyticus* (vibriolisina), a estreptolisina O e a hemolisina de *Listeria monocytogenes* (listeriolisina) (Pinto, 1996).

1.5.2.3. Hepatotoxinas

Hepatotoxina é qualquer substância tóxica capaz de prejudicar o fígado. Alguns cogumelos do gênero *Amanita* e *Aspergillus* produzem aflatoxina, uma hepatotoxina cancerígena, e podem ser encontrados em alimentos armazenados inadequadamente por tempo prolongado. Animais que comem alimentos contaminados com aflatoxina podem passar os seus metabolitos tóxicos aos ovos, leite e carne. (Fratamico et al., 2008)

1.5.2.4. Enterotoxinas

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* de várias estirpes bacterianas, incluindo as diferentes estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus*. São altamente estáveis, resistem a muitas enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina explicando sua atividade no sistema digestivo, e são altamente resistentes ao calor (Le Loir et al., 2003). 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 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. 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. As enterotoxinas exibem semelhanças tanto nas suas múltiplas atividades biológicas quanto nas

suas sequências peptídicas. Elas diferem todavia umas das outras, pela presença de epítomos específicos. Assim sendo, as diferentes estirpes enterotoxigênicas podem expressar toxinas antigenicamente distintas com atividades biológicas similares (Balaban et al., 2000).

Além de ser um problema de ordem de saúde pública, a presença das enterotoxinas resulta em perda econômica para os produtores de alimentos. 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. 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 (Santiliano et al., 2011).

1.6. Métodos de detecção de toxinas

As toxinas bacterianas são geralmente detectadas por meio de métodos imunológicos como, por exemplo, ensaio imunoenzimático, imunodifusão, radioimunoensaio e aglutinação passiva em látex (Bennet, 2005), e, recentemente, também estão a ser utilizados imunossensores.

Para a detecção de toxinas em amostras de alimentos, estas devem ser recolhidas como para qualquer outro exame microbiológico e armazenado sob refrigeração durante curto espaço de tempo. A maioria dos testes rápidos disponíveis atualmente requerem algum tipo de procedimento de extração e purificação antes que se possam detectar toxinas em matrizes alimentares. Alguns dos componentes do alimento podem interferir com o teste propriamente dito e com a interpretação visual dos resultados dos ensaios. É normalmente necessário remover o máximo de gordura e material sólido quanto possível. Técnicas utilizadas incluem centrifugação, filtração através de gaze de algodão hidrófilo, a microfiltração, a diálise, a separação cromatográfica e a utilização de colunas de imunoafinidade. (Alefantis et al., 2004)

1.6.1. Métodos imunológicos clássicos

Os métodos imunológicos baseiam-se na ligação do anticorpo (monoclonal, policlonal ou recombinante) com o antígeno, a fim de obter resultados rápidos e específicos. Os principais métodos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são baseados em imunoenaios e apresentam diferentes limites de detecção. Vários ensaios imunoenzimáticos têm sido utilizados na identificação de enterotoxinas em alimentos, sendo o ELISA Sanduíche o mais utilizado, pois os reagentes são comercialmente disponíveis no formato monovalente e polivalente, ou seja, tanto para o *screening* de toxinas como para identificação de um sorotipo específico. Os kits comerciais

geralmente detectam simultaneamente as enterotoxinas estafilocócicas A, B, C1, C2, C3, D e E, e a maioria dos testes imunológicos baseia-se no ELISA, que tem uma abordagem óptica.

Os ensaios imunológicos são sensíveis e específicos e são base para detecção das enterotoxinas identificadas sorologicamente. A quantidade de enterotoxinas requerida para causar doença no homem depende da susceptibilidade dos indivíduos, dessa forma, o ensaio diagnóstico, além de específico, deve ser sensível o suficiente (Santiliano et al., 2011).

1.6.1.1. Imunodifusão

No método de imunodifusão, a enterotoxina e o anticorpo específico difundem por um gel, e a reação entre ambos forma uma linha de precipitação característica de resultado positivo. A desvantagem do uso desse método é o ajuste das concentrações ideais de anticorpo e enterotoxina para haver formação de precipitação. (Pimenta-Martins et. al., 2013)

1.6.1.2. Radioimunoensaio

No radioimunoensaio, a marcação dos anticorpos é feita com material radioativo que são monitorados na análise quando se ligam à enterotoxina. Esse método requer cuidados especiais durante a manipulação e o descarte da análise. (Pimenta-Martins et. al., 2013)

1.6.1.3. Aglutinação em latex

No método de aglutinação em látex, o anticorpo é associado a partículas de látex que, com a interação antígeno-anticorpo, formam grumos perceptíveis. Esse método, assim como o radioimunoensaio, tem uma baixa sensibilidade na detecção das enterotoxinas (Pimenta-Martins et. al., 2013).

1.6.1.4. ELISA

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. (Santiliano et al., 2011).

1.6.2. Kits imunológicos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos

No mercado, podem ser encontrados diferentes tipos de kits comerciais para detecção das enterotoxinas estafilocócicas baseados nos métodos imunológicos indicados anteriormente. Os testes rápidos são simples e confiáveis, sendo utilizados em uma grande variedade de matrizes de alimentos, em especial leite e queijo, que são frequentemente associados a surtos de intoxicação alimentar (Pimenta-Martins et. Al., 2013). Vernozy-Rozand (2004) 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 especificidade de 82% e 78%, para os kits VIDAS SET e TRANSIA PLATE, respectivamente. Park et al. (1994) avaliaram o kit RIDASCREEN SET quanto à sua eficácia. Os investigadores descrevem que as principais vantagens do kit são (i) um alto grau de especificidade (composições de alimentos e produtos microbiológicos devido ao crescimento de microrganismos não-estafilocócicos não causaram resultados falso-positivos; além disso, nenhuma reação cruzada entre reagentes dos kits foram observados), (ii) excelente sensibilidade (os limites mínimos detectáveis foram de 0,20 a 0,30 ng de SEs por ml de extratos de presunto, salame e cogumelos e de 0,30 a 0,35 ng de SEs por ml de extratos de queijo, 0,50 a 0,75 ng de SEs por g de alimentos como macarrão, presunto, salame, queijo e peru), (iii) simplicidade (o kit permitiu o teste direto de SEs em extratos de alimentos sem a necessidade de extração ou concentração prolongadas, e (iv) rapidez (foram necessárias menos de 3 h para concluir a análise de tipos individuais de enterotoxinas). Os investigadores concluíram que o kit RIDASCREEN SET é uma ferramenta conveniente, rápida e confiável para a detecção e identificação de SEs em alimentos.

1.6.2.1. VIDAS SET

VIDAS SET é um teste de dose única composto por uma tira com reagentes prontos a utilizar e um Recipiente de Fase Sólida (RFS) revestido com anticorpos específicos, com resultados precisos no prazo de um dia com base na técnica de Ensaio de Fluorescência Ligado à Enzima (ELFA) .

1.6.2.2. TRANSIA PLATE

O TRANSIA® PLATE incorpora a tecnologia comprovada do teste anticorpo antígeno "sanduíche" para a detecção de patógenos de origem alimentar em amostras de produtos e

ambientais. Anticorpos altamente específicos revestidos com poços de microtitulação de poliestireno capturam e ligam o antígeno alvo, se presente. Um anticorpo de detecção ligado a uma enzima conjugada é introduzido para formar um sanduíche de anticorpo / antígeno / anticorpo. Finalmente, um substrato é adicionado e convertido pela enzima conjugada para produzir uma mudança de cor indicando a presença do patógeno alvo. As extensas validações AOAC e os controles positivos e negativos integrados se combinam para fornecer a confiança necessária nos resultados.

1.6.2.3. RIDASCREEN SET

O RIDASCREEN SET é um imunoenensaio em enzima sanduíche para a identificação de enterotoxinas estafilocócicas (SE) A, B, C, D, E em fluidos e sólidos alimentares, bem como em culturas bacterianas. Todos os reagentes necessários para o imunoenensaio enzimático estão contidos no kit de teste. Com base em sua sensibilidade, o teste RIDASCREEN® SET é consequentemente claramente superior ao teste de imunodifusão, o qual tem um limite de detecção de 0,1 mg / ml. Geralmente, supõe-se que uma população de 5×10^5 células de *Staphylococcus aureus* produtoras de enterotoxina por grama de comida é necessária para levar a uma intoxicação. No entanto, outros estudos mostram que apenas 100 - 200 ng de enterotoxinas estafilocócicas podem levar a sintomas de alimentos envenenamento. A superfície da placa de microtitulação é revestida com anticorpos específicos que podem se ligar às enterotoxinas contidas na amostra. Os componentes da amostra não específicos do anticorpo não se ligam e então são removidos numa etapa de lavagem. Ao adicionar anticorpos específicos contra as toxinas, bem como moléculas detectoras marcadas com enzimas, o complexo sanduíche será formado (complexo anticorpo-antígeno-anticorpo). Depois de adicionar substrato de enzima / cromogênio aos poços, o conjugado de enzima ligado converte o cromogênio em um produto azul. Essa mudança de cor aponta para a presença de enterotoxinas nas amostras. Os resultados podem ser lidos visualmente ou fotometricamente. Após a adição da solução de paragem que leva a uma mudança de cor de azul para amarelo, a medição pode ser feita em um fotômetro de placa de microtitulação. (Insero do producto RIDASCREEN SET)

McCallum et al. (2019) avaliaram o kit RIDASCREEN SET A, B, C, D, E para uso como teste confirmatório para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em produtos à base de carne; neste estudo participaram sete laboratórios estaduais de agricultura e saúde pública dos Estados Unidos. O estudo demonstrou que o kit é capaz de detectar cada um dos cinco serotipos de enterotoxina em cachorros-quentes, nuggets de frango à milanesa, mortadela e carne de churrasco pronta para comer. As enterotoxinas estafilocócicas foram detectadas num mínimo de 1,0 ng / g em todas as

matrizes e em níveis tão baixos quanto 0,375 ng / g em algumas matrizes. Enquanto a reação cruzada entre alguns tipos é observada, os resultados falso-negativos e falso-positivos foram pouco observados. Quando usado junto com o teste de imunoensaio automático BioMerieux VIDASR SET2, este kit fornece um ensaio secundário para ser usado como confirmação da presença de enterotoxinas estafilocócicas em uma amostra de carne.

1.6.3. Métodos moleculares

Mahfoozi et al. (2019) investigaram a prevalência de *S. aureus* e o tipo de genes de enterotoxina associados em diferentes amostras de alimentos. Para atingir esses objetivos, foram recolhidas 310 amostras, divididas em três grupos (laticínios, carne e doces tradicionais). Após determinação da prevalência de *S. aureus*, a existência de genes 16s rRNA, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* foi avaliada usando teste de PCR multiplex. *Staphylococcus aureus* foi isolado de 103 (33%) amostras. Além disso, a categoria de carne apresentou a maior taxa de contaminação por *S. aureus*. Além disso, as amostras de kebab (61,5%) foram os produtos mais contaminados, seguidos por hambúrguer (47,3%) e sorvete (33,8%). Desses 103 isolados de *S. aureus*, 72 isolados (69,9%) abrigavam pelo menos um tipo dos genes SEs clássicos. A prevalência do gene da enterotoxina tipo A foi detectada com maior frequência que os outros genes da SE.

1.7. Objetivo Geral do estudo

- Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por método de ELISA (RIDASCREEN SET).

1.7.1. Objetivos específicos

- Detectar patógenos alimentares (*Staphylococcus* sp. Coagulase positivo, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, bolores, leveduras e *Bacillus cereus*) em matrizes alimentares por método de cultura.
- Detectar enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares

2. Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

- Tampão PBS, pH 7,4
- Água destilada

- N-heptano (para amostras com alto teor de gordura)
- Infusão Cérebro-Coração (BHI)
- Ácido clorídrico (5N e 1N)
- Hidróxido de sódio (5N e 1N)
- Polietileno glicol 20 000 (PEG)
- Ridascreen SET

2.1.1. Amostras

Foram analisadas 282 amostras associadas a possíveis doenças transmitidas por alimentos que entraram ao serviço de microbiologia de Laboratorios Biogerm.

2.1.2. Equipamentos

- Balança analítica
- Liquidificador, misturador ou equivalente (para homogeneização da amostra). Para soro de leite em pó e todo tipo de alimento difícil de misturar, recomenda-se um turrax para ter uma amostra homogênea.
- Tubos de 50 ml
- Micropipeta de 100 µl
- Incubadora 35 – 37 ° C (95 – 98,6 ° F)
- Pipeta multicanal ou lavador de placas de micropoços
- Espectrofotômetro de placa de micropoços (450/620 ± 10 nm)
- Agitador orbital
- Centrífuga, 3130 a 10 000 g, capaz de ser refrigerada a 4 ° C, tubos de centrífuga
- Membrana de diálise, MWCO: 6 – 8 kD, largura plana: 23 ± 2 mm (por exemplo, Spectra / Por®1, ref: 132 650, Spectrum)
- Fechos, largura de vedação = 35 mm (por exemplo, Spectra / Por®, ref: 132 736, Spectrum)
- Medidor de pH
- Tubos de 50 ml
- Funil
- Gaze de vidro
- Bandeja
- Frigorífico (5 ± 3 ° C / 41 ± 5,4 ° F) e congelador (≤ -18 ° C / ≤ -0,4 ° F)
- Vortex

2.2. Procedimento

2.2.1. Cultura de patógenos alimentares em matrizes alimentares.

O processamento das matrizes alimentares para a cultura de patógenos alimentares foi feita de acordo com a metodologia descrita na norma AFNOR 3M-01/09-04/03A (Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal. Método horizontal de contagem estafilococos coagulase-positiva), ISO 16649-2:2001 Método horizontal de contagem de B- glucuronidase positiva *Escherichia coli*, ISO 11290-2:2017 Método horizontal para detecção e contagem de *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp*, ISO 7937:2004 Método horizontal para contagem de *Clostridium perfringense* e ISO 7932: 2004 Método horizontal para contagem de *Bacillus cereus*

2.2.2. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares por método Ridascreen.

- Armazenar as amostras de 5 ± 3 °C até a extração. Descongelar as amostras antes da etapa de extração. Como as enterotoxinas estafilocócicas podem estar distribuídas heterogeneamente na amostra, homogenizar bem antes de usar.
- Pesar $25 \pm 0,1$ g da amostra misturada e transferir esta parte do teste para um goblé.
- Adicionar 40 mL de água quente destilada (38 ± 2 °C / $100,4 \pm 7,2$ °F) e homogeneizar a mistura usando um turrax, um liquidificador ou um "stomacher". Lave o sistema com água destilada.
- Deixar a toxina se difundir agitando a amostra, em temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos.
- Acidificar a mistura com algumas gotas de ácido clorídrico para obter um pH entre 3,5 e 4,0.
- Centrifugar a mistura pelo menos a $3130 \times g$ por 15 min a 4 °C ($32,9$ °F). Transfira o sobrenadante para um goblé.
- Neutralizar a mistura usando solução de NaOH 1N para obter um pH entre 7,4 e 7,6 e centrifugue novamente como descrito acima. Recupere a fase aquosa neutralizada completa.
- Para cada amostra:
 - Preparar uma solução de polietilenglicol (PEG) a 30% (p / v) (30 g de PEG / 100 mL de água destilada).

- Cortar cerca de 50 a 60 cm de uma membrana de diálise.
- Mergulhar a membrana em água destilada seguindo as instruções do fabricante
- Enxaguar a membrana com água destilada (externa e interna).
- Bloquear uma extremidade da membrana com um fecho, encha-a com a solução aquosa preparada usando um funil e um pequeno pedaço de lã de vidro para descartar partículas em suspensão. Trave a outra extremidade da membrana com um segundo fecho.
- Deitar a membrana de diálise cheia em uma bandeja contendo PEG 30% p/v.
- Deixar os extratos concentrarem-se durante a noite a 5 ± 3 ° C ($41 \pm 5,4$ ° F).
- Retirar a membrana de diálise da solução de PEG e lave a parte externa da membrana com água destilada para remover todos os vestígios de PEG. Recupere o extrato concentrado usando a solução de PBS no caso de extratos que contenham leite ou produtos lácteos ou de osmose no caso de extratos que não contenham leite nem produtos lácteos
- Enxaguar bem a parte interna da membrana de diálise para obter uma concentração final concentrada. extrair massa variando de 5,0 a 5,5 g (máximo de 5,8 g para os extratos de bastão).
- Adicionar 100 µl de uma amostra aos poços, adicione 100 µl de o controlo positivo e negativo. Misture suavemente agitando a placa manualmente. Cobrir a placa e incubar por 1 h a $35 - 37$ ° C ($95 - 98,6$ ° F).
- Descartar o líquido dos poços. Bata no suporte do micropoço de cabeça para baixo sobre uma toalha de filtro limpa (três vezes seguidas) para remover todos os líquido dos poços. Encha os poços com 300 µl por poço de tampão de lavagem (10.1.) e despeje o líquido novamente. Esvazie os poços novamente e remova todos os líquido. Repita a etapa de lavagem mais quatro vezes.
- Adicionar 100 µl de conjugado 1 a cada poço. Misture delicadamente agitando o prato manualmente. Cubra a placa e incube por 1 h a $35 - 37$ ° C ($95 - 98,6$ ° F).
- Despejar o líquido dos poços em uma pia. Bata no suporte do micropoço de cabeça para baixo sobre uma toalha de filtro limpa (três vezes seguidas) para remover todos os líquido dos poços. Encha os poços com 300 µl por poço de tampão de lavagem (10.1.) e despeje o líquido novamente. Esvazie os poços novamente e remova todos os líquido. Repita a etapa de lavagem mais quatro vezes.
- Adicionar 100 µl de conjugado 2 a cada poço. Misture delicadamente agitando o prato manualmente. Cubra a placa e incube por 30 min a $35 - 37$ ° C ($95 - 98,6$ ° F).
- Despejar o líquido dos poços em uma pia. Bata no suporte do micropoço de cabeça para baixo sobre uma toalha de filtro limpa (três vezes seguidas) para remover todos os líquido

dos poços. Encha os poços com 300 µl por poço de tampão de lavagem (10.1.) e despeje o líquido novamente. Esvazie os poços novamente e remova todos os líquido. Repita a etapa de lavagem mais quatro vezes.

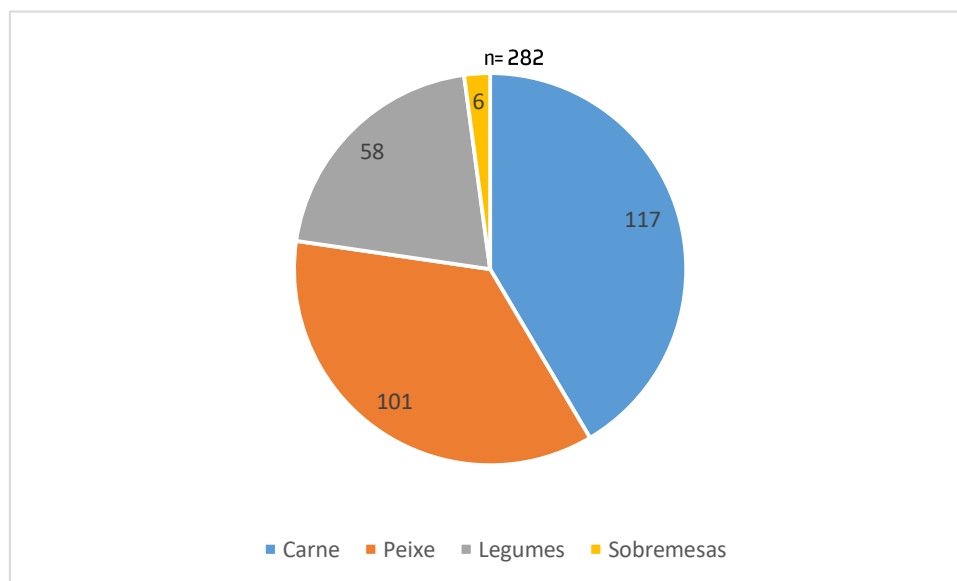
- Adicionar 100 µl de substrato / cromogênio a cada poço. Misture suavemente agitando a placa manualmente. Cubra a placa e incube por 15 min a 35 – 37 ° C (95 – 98,6 ° F).
- Adicionar 100 µl da solução de parada a cada poço. Misture delicadamente agitando o prato manualmente e meça a absorvância a 450/620 ± 10 nm. Leia dentro de 30 minutos após a adição da solução de parada.
- Para avaliar os resultados, utilizar o RIDA@SOFT Win.NET, que é um software especialmente desenvolvido para imunoensaios enzimáticos RIDASCREEN®. Visualmente, uma amostra é considerada "Positiva" quando o controlo negativo é incolor ou azul muito claro e a amostra positiva é significativamente mais forte na cor; uma amostra é considerada "Negativa" quando o controlo negativo é incolor ou azul muito claro e a cor da amostra é mais fraco ou igual à cor do controle negativo. O limite inferior de detecção do kit usando a concentração de diálise é 0,05 ng / g

3. Resultados

3.1. Pesquisa de patógenos alimentares em matrizes alimentares por método de cultura.

As 282 matrizes alimentares selecionadas foram colhidas entre janeiro de 2019 e junho de 2020 e corresponderam a diferentes classes de alimentos preparados prontos para o consumo. As amostras foram selecionadas com base em estar associadas a possíveis intoxicações alimentares; este tipo de amostra foi selecionado por se considerar que existe uma maior probabilidade de obtenção de resultados positivos. Foram investigadas pelo método de cultura *Staphylococcus* coagulase positiva, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, bolores e *Bacillus cereus*.

Figura 1. Distribuição de amostras conforme a sua composição.



Das 282 amostras testadas, apenas 1 (0,35%) apresentou resultado positivo para cultura de *Staphylococcus aureus*; esta amostra foi adicionalmente positiva para *Escherichia coli*. Além disso, foi determinado que do total de amostras testadas, 7 (2,48%) foram positivas para *Escherichia coli*, 2 (0,71%) foram positivas para *Clostridium perfringens* e 2 (0,71%) foram positivas para *Listeria monocytogenes*. Às amostras positivas por cultura corresponderam a refeições de carne e peixe.

3.2. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em matrizes alimentares.

3.2.1 Controlo de qualidade fase de extração por concentração com membrana de diálises.

Para garantir o processo de extração, foram contaminadas amostras de alimentos com estirpes padrões de *Staphylococcus aureus* positivas para cada tipo de enterotoxina estafilocócica, bem como uma cepa de *Staphylococcus aureus* não enterotoxigênico e uma estirpe de *Escherichia coli* O157:H7, que acompanharam o processo de extração junto com as amostras em estudo.

Tabela 1. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em extratos de alimentos contaminados com estirpes control usando o kit RIDASCREEN SET

Alimento contaminado com estirpe 1 (<i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina A)	Alimento contaminado com estirpe 2 (<i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina B)	Alimento contaminado com estirpe 3 (<i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina C)	Alimento contaminado com estirpe 4 (<i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina D)	Alimento contaminado com estirpe 5 (<i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina E)	Alimento contaminado com estirpe 6 (<i>S. aureus</i> não enterotoxigênico)	Alimento contaminado com estirpe 7 (<i>Escherichia coli</i> 0157:H7)
Enterotoxina A-E						
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

3.2.2. Controlo de qualidade do Kit Ridascreem SET

Foi realizado testando estirpes padrões de *Staphylococcus aureus* positivas para cada tipo de enterotoxina estafilocócica, bem como uma cepa de *Staphylococcus aureus* não enterotoxigênico e uma estirpe de *Escherichia coli* 0157:H7. Os controles utilizados foram estirpes caracterizadas em nível molecular pelo Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge. Cada ensaio foi repetido em quadruplicado. As características das estirpes utilizadas e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em estirpes de controle usando o kit RIDASCREEN SET

	Estirpe 1. <i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina A	Estirpe 2. <i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina B	Estirpe 3. <i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina C	Estirpe 4. <i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina D	Estirpe 5. <i>S. aureus</i> produtor de enterotoxina E	Estirpe 6. <i>S. aureus</i> não enterotoxigênico	Estirpe 7 <i>Escherichia coli</i> 0157:H7
Enterotoxina A-E							
1.ª repetição	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
2.ª repetição	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
3.ª repetição	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
4.ª repetição	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Das 282 amostras testadas, 2 (0,71%) apresentaram resultados positivos para enterotoxinas no kit RIDASCREEN SET correspondendo a dois APCs de carne; ambas as amostras foram negativas por cultura para todos os microrganismos investigados.

4. Discussão

Em relação aos resultados de cultura de matrizes alimentares possivelmente relacionadas a intoxicações, as baixas taxas de positividade obtidas (*Escherichia coli* 2,48%, *Clostridium perfringens* 0,71%, *Listeria monocytogenes* 0,71% e *Staphylococcus aureus* 0,35%) possivelmente estão relacionadas ao fato das amostras obtidas serem alimentos preparados prontos para o consumo, nos quais o processo de cozimento dos alimentos pode, em muitos casos, ter afetado a viabilidade de bactérias patogénicas que poderiam estar presentes, mas mesmo assim nos casos em que o patógeno produz enterotoxinas resistentes ao calor (como no caso de *S. aureus*), resultados de cultura negativos podem ser obtidos, mas esta toxina ativa capaz de causar doença gastrointestinal pode estar presente nos alimentos.

Sendo que os resultados positivos para cultura de patógenos foram apresentados em APC de carne e peixe se pode dizer que este tipo de alimentos são mais suscetíveis que APC de legumes e sobremesas, sendo importante ver os tempos de cozedura e temperaturas de cocção dos alimentos

Sivakumar et al (2019) avaliaram os alimentos de rua como fonte de MRSA, para os quais 430 alimentos de origem animal vendidos na rua na Índia (carne, leite, ovos e seus produtos) foram processados para isolamento e caracterização de *Staphylococcus aureus*; 14 amostras (3,25%) foram positivas para *Staphylococcus aureus* produtoras de enterotoxina A.

Cho et al. (2019). determinaram o perfil do gene de toxina, produção de toxina, sorotipo de coagulase de resistência a antibióticos e diversidade genética de isolados de *Staphylococcus aureus* coletados de 1.464 produtos de panificação recheados com creme na Coreia, detectando que um total de 10 isolados (0,68%) produziram um ou mais enterotoxina estafilocócica.

Os estafilococos coagulase negativos também têm sido implicados em alguns casos de intoxicação alimentar. No estudo de El-Nagar et al. (2017) em material recolhido da cadeia de produção avícola, genes de enterotoxinas (*seb*, *sec* e *sea*) foram encontrados em cinco estirpes (23,8%) de *S. aureus*, com uma percentagem de 9,5% para *seb* e *sec* e 4,8% para *sea*, enquanto *sec* e *see* foram encontrados em seis (20,6%) isolados de estafilococos coagulase negativos, com uma percentagem de 10,3% para cada. O gene *sec* foi detectado em dois isolados de *S. xylosus* e um isolado de *S. simulans*, enquanto o gene *ver* foi detectado em *S. xylosus*, *S. warnerie* e *S. simulans*. No estudo de Pyzik et al. (2019), 3 (2.36%) das 127 estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativos testadas encontradas em 547 amostras de frango e peru na Polónia tinham genes responsáveis pela produção de uma das cinco enterotoxinas estafilocócicas clássicas: duas estirpes de *S. hominis* continham o gene *see*, responsável pela produção da enterotoxina E, e a presença do gene responsável pela produção da enterotoxina B (*seb*) foi encontrada numa estirpe de *S. epidermidis*.

No presente estudo, a percentagem de amostras positivas para enterotoxinas foi bastante baixa (0,71%) que correspondiam a APC de carne e nessas amostras nenhum microrganismo foi detectado pelo método de cultura; isso pode ter sido devido ao fato de que as estirpes de *Staphylococcus* que produzem a referida toxina terem ficado inviáveis durante o processo de cozedura e preparação dos alimentos (visto que se tratavam de alimentos prontos para consumo) enquanto que as enterotoxinas termoestáveis permaneceram intactas ou, em alternativa, as referidas enterotoxinas foram produzidas por estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa, espécies que não são detectadas pelo protocolo de cultura utilizado; porém, a detecção de enterotoxinas nessas amostras, independentemente da presença ou não de resultado positivo para cultura, são importantes do ponto de vista de saúde pública, pois sua ingestão pode causar doença gastrointestinal ao paciente que consome o alimento.

5. Conclusão

Nesta investigação, o RIDASCREEN SET mostrou ser adequado para ser usado na detecção de toxinas estafilocócicas em matrizes de alimentos no nosso laboratório. Além disso, os resultados deste estudo, apesar de limitados, demonstram a importância da investigação de enterotoxinas estafilocócicas diretamente, em amostras de alimentos com suspeita de relação com intoxicação de origem bacteriana, sem se restringir exclusivamente às amostras que apresentam contagens elevadas de *Staphylococcus aureus*. Suportam essa conclusão a discrepância entre os resultados da cultura e a detecção de toxinas evidenciada neste estudo. Da mesma forma, com base nos resultados obtidos, conclui-se que é importante expandir a pesquisa para outras matrizes alimentares, como alimentos crus, uma vez que atualmente existem muitas refeições onde os alimentos são colocados crus ou com pouca cozedura e as enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes sem ser necessariamente detectadas.

6. Referencias

- Alefantis, T.; Grewal, P.; Ashton, J.; Khan, 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. *Molecular and Cellular Probes*, London, v. 18, n. 6, p. 379–382.
- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. (2003). An Extensive Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to Low-Fat Milk in Japan: Estimation of Enterotoxin A in the Incriminated Milk and Powdered Skim Milk. *Epidemiol Infect*;130(1):33–40.
- Balaban, N., Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1–10.
- Bennet, R. W. (2005). Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in food by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *Journal of Food Protection* v. 68, n. 6, p.1264–1270.
- Bernadette D. Gombossy de Melo Franco, Mariza Landgraf. (2005). *Microbiologia dos Alimentos*. Atheneu. ISBN-10: 8573791217
- Cho YS, Lee MK, Hwang SH. (2019). Toxin gene profiles, genetic diversity, antimicrobial resistance, and coagulase type of *Staphylococcus aureus* from cream-filled bakery products. *Food Science & Nutrition*; 7(5):1727–1734. DOI: 10.1002/fsn3.1011.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
- Cunha Neto, Adelino da, Silva, Celiane Gomes Maia da, & Stamford, Tânia Lúcia Montenegro. (2002). Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Food Science and Technology*, 22(3), 263–271. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612002000300012>
- Dehkordi M, Shamsabadi M, Banimehdi P. (2019). The occurrence of *Staphylococcus aureus*, enterotoxigenic and methicillin-resistant strains in Iranian food resources: a systematic review and meta-analysis. *Ann Ig*; 31(3):263–278. doi:10.7416/ai.2019.2289
- Dinges, M. M.; Orwin, P. M.; Schlievert, P. M. (2000). Exotoxin of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 13, n. 1, p. 16–34.
- El-Nagar S., El-Azeem M.W.A., Nasef S.A., Sultan S. (2017). Prevalence of toxigenic and methicillin resistant staphylococci in poultry chain production. *J Adv Vet Res*; 7, 33–38.

- EN ISO 6888-1:2000/A2:2019. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird–Parker agar medium – Amendment 2: Inclusion of an alternative confirmation test using RPFA stab method (ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018).
- Evenson M, Ward Hinds M, Bernstein R, Bergdoll M. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol*; 7(4):311-6.
- Fratamico, PM; et al., eds. (2008). *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press.
- Furtado R, Coelho A., Correia C., Saraiva M., Cunha I., Calhau M. (2014). Enterotoxinas estafilocócicas em géneros alimentícios. *Observações do Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*. 13 (3) 48-50
- Hennekinne J., Ostyn A., Guillier F., Herbin S., Prufer A., Sylviane Dragacci. (2010). How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxins* 2, 2106–2116; doi:10.3390/toxins2082106
- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*; 36(4):815–36.
- ISO 9000 Sistema de gestão da qualidade em ambientes de produção
- ISO/IEC 17025 General Requirements for Competence of Test and Calibration Laboratories
- Kim H, Griffiths M, Fazil A, Lammerding A. (2009) Probabilistic Risk Model for Staphylococcal Intoxication from Pork-Based Food Dishes Prepared in Food Service Establishments in Korea. *J Food Prot*; 72(9):1897–908.
- Lawrynowicz-Paciorek, M.; Kochman, M.; Piekarska, K.; Grochowska, A.; Windyga, B. (2007). The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *Int J Food Microbiol*; 117(3):319–23. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.009.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63–76.
- Machado, Virginia, Pardo, Lorena, Cuello, Dianna, Giudice, Guillermina, Luna, Patricia Correa, Varela, Gustavo, Camou, Teresa, & Schelotto, Felipe. (2020). Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food, food establishment

surfaces and cases of foodborne diseases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62, e5. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062005>

- Macori G., Bellio A., Bianchi D., Chiesa F., Gallina S., Romano A., Zuccon F., Cabrera-Rubio R., Cauquil A., Merda D., Auvray F., Decastelli L. (2020). Genome-Wide Profiling of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Strains Used for the Production of Naturally Contaminated Cheeses. *Genes* 11, 33; doi:10.3390/genes11010033
- Mahfoozi, A.; Shirzad-Aski, H.; Kaboosi, H. and Ghaemi, E. A. (2019). Identification of the classical enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* in various foods by multiplex PCR assay. *IJVR*, Vol. 20, No. 3, Ser. No. 68, 209–212
- McCallum K, Kondratko D, Phillips R. (2019). Multi-laboratory evaluation of staphylococcal enterotoxin detection by the RIDASCREEN SET A, B, C, D, E ELISA kit. *Journal of Regulatory Science* 7:1–8
- Mehramuz B, Taghizadeh S, Kafil HS, et al. (2020). High rate of contamination with *Staphylococcus aureus* in traditional Koozeh cheeses. A molecular typing approach. *Ann Ig.*;32(2):178–185. doi:10.7416/ai.2020.2341
- Ostyn A, Guillier F, Pruger AL, et al. (2011). Intra-laboratory validation of the Ridascreen® SET Total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Letters in Applied Microbiolog.*; 52(5):468–474. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2011.03025.x.
- Park C., Akhtar M., Rayman M. (1994). Evaluation of a Commercial Enzyme Immunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D, and E in Foods. *Applied And Environmental Microbiology*, 60(2): 677–681
- Pimenta-Martins M et al. (2013). Métodos de análises rápidas para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. *Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical*.
- Pinto, A. (1996). Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Millenium*, 4:91–100
- Pyzik E, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Urban-Chmiel R, Jarosz ŁS, Jagiełło-Podębska I. (2019). Detection of Antibiotic Resistance and Classical Enterotoxin Genes in Coagulase – negative *Staphylococci* Isolated from Poultry in Poland. *J Vet Res.* 2019;63(2):183–190. Published 2019 Jun 12. doi:10.2478/jvetres-2019-0023
- SANTILIANO, F.C. et al. (2011). Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. *PUBVET*, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1009.

- Sarewitz, S. (2013). College of American Pathologist Accreditation Programs Audioconferences and Webinars - CAP Accreditation Requirements for Validation of Laboratory Tests. Disponible: www.cap.org

- Simpson, L. L. (1986). Molecular Pharmacology of *Botulinum* Toxin and Tetanus Toxin. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 26 (1): 427-53
- Sivakumar, M., Dubal, Z.B., Kumar, A. et al. (2019). Virulent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in street vended foods. J Food Sci Technol 56, 1116–1126. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03572-5>
- Veras J., Do Carmo L., Tong L., Shupp J., Cummings C., Dos Santos D., Cerqueira M., Cantini A., Nicoli J., Jett M. (2008) A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 12, n. 4, p. 410–415.
- 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.
- WHO. World Health Organization. Food safety and foodborne illness, n. 237, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>>.
- Yu S, Yu P, Wang J, Li C, Guo H, Liu C, Kong L, Yu L, Wu S, Lei T, Chen M, Zeng H, Pang R, Zhang Y, Wei X, Zhang J, Wu Q and Ding Y (2020) A Study on Prevalence and Characterization of *Bacillus cereus* in Ready-to-Eat Foods in China. *Front. Microbiol.* 10:3043. doi:10.3389/fmicb.2019.03043