

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS SEA, SEB E SEC PARA USO NA PREPARAÇÃO DE REAGENTES IMUNOENZIMÁTICOS COM DUAS RESINAS DE TROCA IÔNICA: RED A DYE RESIN E RESINA CG-50

PRODUCTION AND PURIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS SEA, SEB, SEC TO BE UTILIZED IN THE PREPARATION OF IMMUNE ENZYMATIC ASSAY USING CHROMATOGRAPHY WITH TWO RESINS OF ION EXCHANGE: CG-50 AND RED A DYE RESIN

Luiz Simeão do Carmo^{1,2}, Valter Roberto Linardi²,
Deise Aparecida dos Santos¹, Merlin S. Bergdoll^{1,3},
Maria Jose de Sena⁴, Luiz Guilherme Heneine¹

Resumo

As enterotoxinas (SEs) são responsáveis pela intoxicação alimentar causada pela presença de linhagens de estafilococos enterotoxigênicos em alimentos. Esse tipo de intoxicação alimentar é uma das mais comuns, sendo de ocorrência mundial. As intoxicações causadas pela ingestão de alimentos que contêm a enterotoxina estafilocócica permanecem como a causa principal de intoxicação alimentar em países onde existem estatísticas confiáveis. São denominadas enterotoxinas pelo fato de seu alvo de ação ser o trato intestinal. Vômito e diarreia ocorrem, geralmente, entre 2 e 6 horas, após

Abstract

Staphylococcal enterotoxins (SEs), which are the agents responsible for staphylococcal food poisoning, are produced in foods by enterotoxigenic staphylococci grown in foods. This kind of food poisoning happens worldwide and is the leading cause of food poisoning in many countries where records of food poisoning outbreaks are kept. The detection and identification of the factor in those foods involved in this type of food poisoning is fundamental in controlling food poisoning. They are named enterotoxins because of their effects on the gastrointestinal tract. Vomiting and

¹ Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Enterotoxinas¹
carmols@pop.com.br

² Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG)

³ Food Research Institute, University of Wisconsin

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco

a ingestão do alimento contaminado. Diferentes métodos têm sido usados na purificação das enterotoxinas, com o intuito de obtê-las de forma mais pura. Novos métodos, porém, têm sido pesquisados, visando maior recuperação da enterotoxina com grau de pureza mais elevado e de forma mais rápida. Neste trabalho, foi usado um método de cromatografia com a resina denominada Red A Gel, para a purificação de enterotoxina. As enterotoxinas SEA, SEB e SEC₂ foram purificadas com um alto grau de pureza.

Palavras chave: Enterotoxina estafilocócica – Enterotoxina SED – Purificação de enterotoxina

diarrhea occur within 2-6 hours after ingestion of food contaminated with these substances. A number of methods has been used to purify Staphylococcus enterotoxins, but the search for new methods continues in order to improve their recovery as pure protein. This paper relates the use of RED A Gel chromatographic method developed to purify enterotoxins. Enterotoxins SEA, SEB and SEC₂ were highly purified as pure proteins.

Keywords: *Staphylococcal enterotoxins – enterotoxin SED – Enterotoxin purification.*

1 Introdução

Intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica é uma das doenças de origem alimentar mais comum e é de ocorrência mundial. Essas enterotoxinas pertencem a um grupo de proteínas extracelulares produzidas por algumas linhagens de estafilococos e constituem um grupo de proteínas cuja ação biológica tóxica inclui: toxi-infecção alimentar (SFP), vários problemas de pele, síndrome do choque tóxico (TSST), além de desarranjos no sistema autoimune. Vômito e diarreia, em um espaço de 2 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado, são as características desse tipo de intoxicação.

De acordo com Bergdoll (1989), nos Estados Unidos, em 1981, das doenças alimentares de origem bacteriana relatadas ao Centers for Disease Control (C.D.C.), 17,6% tiveram como causa a ingestão de alimentos que continham a enterotoxina estafilocócica. No Brasil, segundo os dados da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS), no período de 1999 a 2007, foram relatados cerca de 2.865 casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos; entre os agentes envolvidos, a salmonella e o estafilococos foram responsáveis por 62% dos casos. As

enterotoxinas estafilocócicas são responsáveis pela toxi-infecção alimentar causada pela presença de linhagens de *Staphylococcus* spp enterotoxigênicos em alimentos. Esse tipo de intoxicação é uma das mais comuns, sendo de ocorrência mundial. As toxi-infecções causadas pela ingestão de alimentos contaminados com enterotoxina estafilocócica permanecem como a causa principal de intoxicação alimentar em países onde existem estatísticas confiáveis (GENIGEORGES, 1989).

O aparecimento de sintomas, tais como vômito, diarreia, tonteira e queda da pressão sanguínea, em um espaço de quinze minutos a seis horas após a ingestão do alimento, é característico da intoxicação, podendo em alguns casos ser grave, levando a pessoa acometida a necessitar de cuidados médicos (BERGDOLL, 1989; HALPPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989; CARMO *et al.*, 2001). Na maioria dos casos, pelo fato de os sintomas serem brandos e de curta duração, as pessoas acometidas não procuram os serviços médicos, dificultando, assim, a obtenção de dados a respeito desse tipo de intoxicação no Brasil. Segundo Carmo *et al.* (2004),

Veras *et al.* (2008), embora não exista um levantamento estatístico sobre intoxicação estafilocócica no Brasil, alguns surtos foram reportados nos últimos anos: Em Minas Gerais, nos últimos dez anos, alimentos suspeitos de causarem toxinfecção alimentar, acometendo mais de quatro mil e quinhentas pessoas, foram enviados ao laboratório de enterotoxinas da Fundação Ezequiel Dias para estudo. Na análise desses alimentos, foi detectada a presença de estafilococos enterotoxigênicos e de suas enterotoxinas. Os alimentos envolvidos foram predominantemente queijos, bolos confeitados, produtos cárneos e refeições prontas. Tais alimentos são amplamente consumidos e constituem excelente substrato para o crescimento do *S. aureus* e a consequente produção de enterotoxina.

Alguns surtos examinados revelaram dados assustadores, o que vem comprovar que esse tipo de toxinfecção é uma das mais comuns, daí a necessidade de uma detecção rápida e eficaz, uma vez que, à medida que a indústria de alimentos se desenvolve, o controle das enterotoxinas se torna indispensável. Em um dos surtos examinados, 38 pessoas foram hospitalizadas por causa de uma intoxicação após ingerirem queijo contaminado com *S. aureus* enterotoxigênico, segundo Carmo & Bergdoll (1990). Em um jantar de confraternização envolvendo 8 mil pessoas, aproximadamente 4 mil foram hospitalizadas com sintomas típicos de intoxicação por enterotoxina estafilocócica, e, entre essas, 396 atendidas em UTI estado gravíssimo, em razão da desidratação e da hipotensão, tendo ocorrido 16 óbitos (CARMO *et al.*, 2004).

De acordo com os dados da Fundação Ezequiel Dias, entre as 341 amostras de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar analisadas no período de dezembro de 1985 a dezembro de 1990, 106 foram de queijo tipo minas; 28 foram de bolos recheados; 160, de embutidos diversos (CARMO, 2001). Amostras de leite materno provenientes de 20 doadoras de um banco de leite, examinadas pelo laboratório de

enterotoxinas da Fundação Ezequiel Dias, apresentaram contagem elevada de *S. aureus*, e, entre estas, linhagens enterotoxigênicas. Considerando que esse leite, antes de ser servido aos lactentes, é aquecido a 62°C por vinte minutos, temperatura suficiente para destruir o microrganismo, mas não inativar a enterotoxina.

Segundo levantamento realizado no livro de registros do laboratório de alimentos da Fundação Ezequiel Dias, abrangendo o período de 1991 até outubro de 2000, foram registrados e relatados por Carmo (2001), os seguintes dados: entre março de 1990 a outubro de 2000, 321 alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar foram analisados. Em 225 alimentos, foi confirmada a presença de microrganismos patogênicos, e, entre os patógenos isolados, *Staphylococcus aureus* foi detectado em 171 alimentos. Entre os alimentos envolvidos, 92 eram de produtos lácteos, e 79, de produtos cárneos diversos. Na investigação desse tipo de intoxicação, é necessário que seja detectada a presença da enterotoxina liberada pelos estafilococos no alimento e/ou testar se o microrganismo isolado é enterotoxigênico. O único método viável para detectá-la é com o uso de anticorpos específicos.

Este trabalho teve como objetivo a produção e a purificação das enterotoxinas SEA, SEB e SEC₂ para serem utilizadas em ensaios imunoenzimáticos, OSP e ELISA.

1.1 Características das enterotoxinas

Em 1963 foi estabelecida a classificação das enterotoxinas como metabólitos imunológicos distintos e identificadas por meio de uma sequência de letras como nomenclatura sistemática (DACK, 1963). São denominadas por letras sequenciais, iniciando-se por: SEA, SEB, SEC_s, (SEC₁, SEC₂ e SEC₃), SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Existem na literatura vários estudos sobre a genética, a bioquímica e as propriedades biológicas das enterotoxinas estafilocócicas (BERGDOLL

et al., 1961; BERGDOLL, 1983; BERGDOLL, 1989; CARMO, 2001).

As enterotoxinas têm sido purificadas para uso em ensaios imunoenzimáticos por diferentes métodos (CASMAN *et al.*, 1967; BERGDOLL *et al.*, 1985). Esses métodos consistem usualmente de três a quatro cromatografias de troca iônica, seguidas de gel filtração, consumindo tempo, além de recuperar pouca quantidade de enterotoxina. Um dos métodos de purificação de proteína e citado na literatura é de uma Cromatografia com Red A Gel Resin, desenvolvida por Reynolds *et al.* (1988). Utilizando esse método, Brehm *et al.* (1990) purificaram as enterotoxinas SEA, SEB e SEC₂ com uma única etapa de cromatografia após concentrar o sobrenadante da cultura com uma etapa de gel filtração, seguida de uma diálise, recuperando em torno de 60% da enterotoxina contida no filtrado.

2 Material e métodos

2.1 Microrganismos usados na produção das enterotoxinas SEA, SEB e SEC

A linhagem de *Staphylococcus aureus* utilizada na produção de SEA foi a 722m; na produção de SEB, a S-6, e na produção de SEC₂, a 361, todas preservadas em cápsulas de porcelana, segundo Hunt *et al.* (1958) e mostrado na FIG. 1.

2.2 Reativação dos microrganismos para a caracterização da enterotoxigenicidade e preparação do inóculo

Uma cápsula de porcelana impregnada com o microrganismo foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, que continha 125 mL de caldo infuso de cérebro e coração de boi (BHI), acrescido de extrato de levedura a 1% e 0,1 % de fosfato dibásico de potássio e incubado a 37°C por 24 horas. Tal procedimento foi o mesmo para cada uma das linhagens utilizadas nesse experimento.

Figura 1: Tubos de ensaio com uma das linhagens de *S. aureus* produtora de enterotoxina aderida em cápsulas de porcelana (cultura estoque)



2.3 Produção de enterotoxina SEA com cultivo em frasco com tubo de diálise

2.3.1 Reativação do microrganismo

A linhagem produtora de SEA utilizada nesse experimento foi a 722, preservada em cápsula de porcelana, segundo Hunt *et al.* (1958), conforme mostrado na FIG. 1. Trata-se de um mutante desenvolvido no Japão e que, dependendo do método e do meio de cultura utilizados, chega a produzir até 8 mg/mL de enterotoxina, o que significa oito vezes mais do que as linhagens selvagens comumente envolvidas em surtos.

2.3.2 Meio de cultura e método de produção

Em um tubo de diálise de 55 cm de comprimento, com uma das extremidades amarrada, foram colocados 100 mL do meio de cultura BHI em dupla concentração e acrescido de extrato de levedura a 1%. Em seguida, tomando-se o cuidado de expulsar o ar do restante do tubo, a outra parte foi também amarrada, evitando-se, assim, a saída do meio de cultura. O tubo foi acondicionado com auxílio de um bastão de vidro dentro de um frasco de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, de modo a ocupar todo o fundo desse; o frasco foi fechado com tampão de algodão e autoclavado por 15 minutos a 121°C

(FIG. 2). Após essa operação, foram adicionados assepticamente ao frasco 60 mL de PBS 0,02 mol/L pH 7,4. O frasco, assim preparado, foi inoculado com 2 mL de uma cultura de 24 horas, elaborada (preparada) conforme descrito em 2:2.

Nessas condições, foram manipulados 21 frascos por produção. Os frascos foram incubados sob agitação em um agitador orbital, por 24 horas a 180 rpm e a uma temperatura oscilando entre 37°C e 40°C. O crescimento produzido foi medido em proveta, vertido para tubo de centrífuga de 500 mL de capacidade e centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para frascos de plástico, com tampa, identificados com o nome do meio de cultura e a técnica de produção utilizada e levados para o freezer. Após adição de 2 mL de timerosol (1:1000) e leitura de pH, foi retirada uma alíquota para quantificar a produção de enterotoxina no sobrenadante, pelo método de OSP (Sensibilidade Ótima em Placa), conforme mostrado na TAB. 1.

Preparação dos frascos:

Figura 2: Preparação do tubo de diálise com 100 mL do meio de BHIx2 ELK em dupla concentração e colocados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL utilizados na produção da enterotoxina SEA:

A – Erlenmeyer com os tubos de diálise com meio de cultura BHI em dupla concentração e acrescido de extrato de levedura a 1%.

B – Frasco com o tampão K_2HPO_4 a 0,1% e 60 mL de PBS 0,02 mol/L pH 7,4 pronto para ser inoculado.

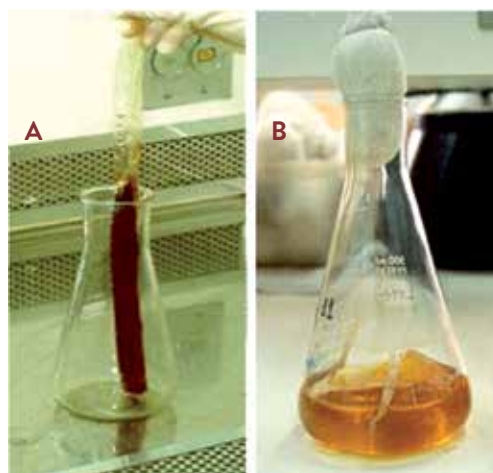


Tabela 1: Produção de enterotoxina SEA^(c) com cultivo em frasco^(b) com tubo de diálise e o meio BHI2XELK^(a)

PROD. N°	N° DE FRASCOS P/ PRODUÇÃO	VOL. DE CALDO P/ PROD. (mL)	SEA (MÉDIA/mg/mL)(d)	SEA TOTAL P/ PROD. (MG)
1	21	1.380	40	55,2
2	21	1.185	40	47,4
3	21	1.231	40	49,3
4	21	1.383	40	53,3
5	21	1.263	40	50,5
TOTAL	105	6.442	40	255,7

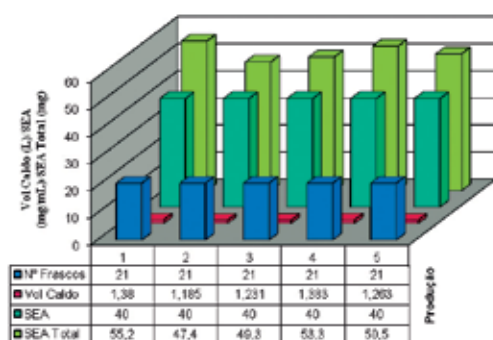
a) Caldo BHI em dupla concentração, extrato de levedura 1% e K_2HPO_4 , 1%.

b) Frasco de Erlenmeyer de 500 mL, 180 rpm, com 60 mL de tampão fosfato de sódio e inóculo de 2 ml por frasco e incubação a 37°C por 24 horas.

c) Linhagem 722 FRI: produtora de enterotoxina SEA. Com inóculo 2 mL (10^8 UFC/mL).

d) A quantidade total de enterotoxina produzida nas cinco repetições foi de 255,7 mg e foi determinada por Imunodifusão em Gel (OSP).

Gráfico 1: Produção de enterotoxina SEA em cultivo em frasco com tubo de diálise com o meio BHI2XELK e inóculo de 2 mL (10^8 ufc/ml)



Na TAB. 1 e no GRAF. 1, acima, são apresentados os resultados da produção da enterotoxina com o meio complexo BHIx2ELK, usando cultivo em frasco com tubo de diálise sob agitação, na produção de SEA, em cinco produções com 21 frascos por repetição (capacidade do agitador) com média de 40 μ g/mL ou 51 mg por produção, perfazendo um total de 255,7 mg nas cinco produções, o que vem evidenciar a eficiência do método e do meio de cultura escolhidos.

2.4 Purificação da enterotoxina SEA com CG – 50 e Red – Dye Ligant Resin

2.4.1 Extração tipo “batch” da enterotoxina SEA com a resina CG – 50

Foram utilizados 2.000 mL de “crude” que continha 60 mg de enterotoxina, produzido com o meio BHIx2ELK com a linhagem FRI 722 e o método do tubo de diálise sob agitação, conforme descrito no item 2. O “crude”, após ter o pH ajustado para 5,6, com HCl 5 mol/L, foi diluído cinco vezes com água destilada e adicionado de 150mL da resina CG-50. No cultivo com tubo de diálise, o crescimento bacteriano ocorre no tampão em volta do tubo, ou seja, separado do meio de cultura pela membrana de diálise, desse modo o crescimento é mais fluido, claro e com menos resíduos de meio de cultura, motivo pelo qual foi diluído apenas 5 vezes.

Tabela 2: Extração de enterotoxina SEA do “crude” com a resina CG-50^a e eluída com tampão PBS^b

EXTRAÇÃO / ELUIÇÃO	QUANTIDADE (c) ELUÍDA mg/100 mL	TOTAL DE SEA P/ ELUIÇÃO (mg)	PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO P/ EXTRAÇÃO	TOTAL NÃO RECUPERADO (mg)
1 ^a	16.000	16,0	26,7	
2 ^a	10.000	10,0	16,7	
3 ^a	8.000	8,0	13,3	
4 ^a	6.000	6,0	10,0	
5 ^a	4.000	4,0	6,7	
6 ^a	1.000	1,0	1,7	13,5
7 ^a	800	0,8	1,3	
8 ^a	400	0,4	0,6	
9 ^a	200	0,2	0,3	
10 ^a	100	0,1	0,16	
TOTAL	46.500	46,5	77,5	22,5

- Resina de troca iônica normalmente usada na purificação de proteínas básicas.
- Tampão de eluição PBS 0,5 mol/L, pH 6.2.
- Cálculo feito por O.S.P.

Na extração das enterotoxinas do “crude”, foi usada uma cromatografia tipo “batch” com uma resina de troca iônica o amberlite CG-50. A extração das enterotoxinas com 150 mL de resina para 2.000 mL de “crude” mostrou-se bastante eficiente, considerando a quantidade de enterotoxina recuperada. Na TAB. 2 e no GRAF. 1, estão apresentados os resultados das dez eluições de SEA com 100 mL de tampão por eluição, com um percentual de recuperação de 77,5%, correspondendo a 46,5 mg e 13,5 mg não recuperados, o que significa 22,5%, e desses, 13,5 mg não foram adsorvidos pela resina, e 2,0 mg não foram eluídos conforme os dados mostrados na TAB. 2. A FIG. 3A mostra a purificação inicial da enterotoxina SEA com uma coluna de Red – A – Gel, e a FIG. 3B 14 detalha a purificação final de SEA, usando uma coluna de resina CEPHARY S – 200.

Figura 3A: Cromatografia de SEA em uma coluna de Red-A-Gel (2,1 cm x 40 cm) inicialmente lavada com tampão KHPO_4 0,01 mol/L, pH 6.5, em continuação, 250 mL de eluído preparado conforme descrito no item 4.2, que continha 150 mg de SEA. Depois de concentrado para 50 mL, foi aplicado na coluna empacotada com a resina até uma altura de 40 cm, aproximadamente, com um fluxo de 54 mL/h, com a bomba ajustada para 2x10. Em seguida, a coluna foi lavada *overnight* com tampão 0.01 mol/L, pH 6.8. A enterotoxina SEA foi eluída com tampão KHPO_4 0,15 mol/L, pH 6.8. Alguma enterotoxina SEA foi detectada nas frações de A e C, porém, a maior quantidade foi detectada em B 80mg.

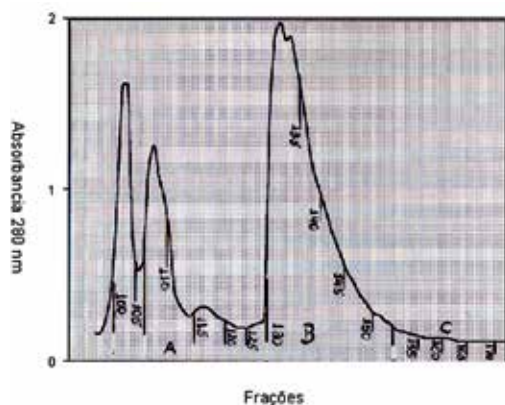
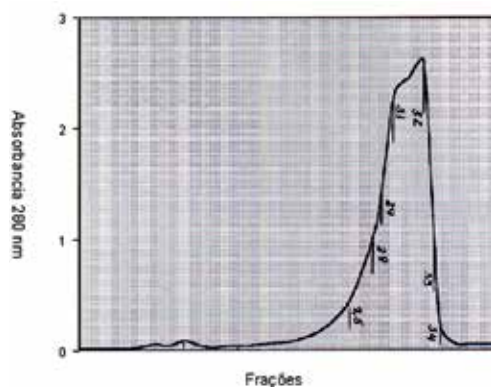


Figura 3B: Cromatografia de SEA em uma coluna de Sephacryl S-200 (2,1 cm x 117 cm) inicialmente lavada com tampão KHPO_4 0,05 mol/L, pH 6.8, que continha NaCl 0,5 mol/L. O total de 80 mg de enterotoxina SEA liofilizada formada pelos picos A e B foi dissolvido em 2 mL de tampão de equilíbrio, centrifugado, e, em seguida, aplicado na coluna de Sephacryl. A coluna foi corrida com o mesmo tampão, a bomba foi ajustada para 2,5, e o volume das frações, para 10 mL. SEA foi detectada nas frações 25, 28 e deste até 33. As frações 28 a 32 foram combinadas totalizando 50 mL, contendo 68,7 mg de enterotoxina (pela leitura do espectrofotômetro), e alíquotadas em porções de 2,0 mL em frascos apropriados e liofilizadas para uso nas imunizações. As frações 24, 27 e 33 foram combinadas para serem usadas nos ensaios de imunodifusão em gel (OSP) e ELISA.



3 Produção de enterotoxina SEB com cultivo em frasco sob agitação

3.1 Reativação do microrganismo

A linhagem produtora de SEB utilizada nesse experimento foi a S-6 preservada em cápsula de porcelana, segundo Hunt *et al.* (1958), conforme mostrado na FIG. 1. Essa cepa foi selecionada no FRI após uma série de repiques de uma linhagem inicialmente produtora das enterotoxinas SEA e SEB, mas perdeu a capacidade de produzir SEA, passando a gerar somente SEB; dependendo das condições de crescimento e incubação, chega a produzir entre 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enterotoxina.

3.2 Produção de enterotoxina SEB com cultivo em frasco de Fehrembach sob agitação, com o meio TELK

Neste trabalho, foi empregado um meio utilizado por Carmo (2001), à base de triptona 4%, enriquecido com extrato de levedura 1% e fosfato de potássio 0,1%, empregando-se quatro frascos Fehrembach, por produção. Foi obtida, nas quatro produções, uma média de 256 mg por produção, perfazendo um total de 1.024 mg nas quatro produções. Em pesquisa anterior, Carmo (1997), testando diferentes hidrolisados de caseína, verificou que a triptona adicionada de extrato de levedura demonstrou melhor desempenho na produção de SEB, obtendo uma média de 194 mg/repetição e que a adição do potássio melhorou significativamente a produção. No presente experimento, foram usados quatro frascos com um total de 2.000 mL de caldo, com média de 128 µg/mL de enterotoxina. Multiplicando essa média por 500 mL, tivemos 64 mg/frascos, que, multiplicados por quatro (nº de frascos por produção), corresponderam a 256 mg/produção.

Meios de cultura usados na produção de SEB e SEC, 4% triptona, 1,0 gr, K_2HPO_4 , extrato de levedura 10g e H_2O destilada 1000 mL, pH $7.0 \pm 0,2$ em frasco de Fehrembach sob agitação a 180rpm/minuto e incubado a $37^\circ C \pm 0,2$.

Figura 4: Neste experimento, foram usados quatro frascos com um total de 2.000 mL de caldo, com média de 128 µg/mL de enterotoxina; multiplicando essa média por 500 mL, obteve-se 64 mg/frasco, que, por sua vez, multiplicadas por quatro (nº de frascos por produção), corresponderam a 256 mg/produção.



Tabela 3: Produção de enterotoxina SEB^(a) com cultivo em frasco^(b) sob agitação, com o meio TELK^(c)

PROD. Nº	Nº DE FRASCOS P/ PRODUÇÃO	VOL. DE CALDO P/ PROD. (mL)	SEB (MÉDIA/mg/mL) ^(d)	SEB TOTAL P/ PROD. (mg)
1	4	2.000	128	256
2	4	2.000	128	256
3	4	2.000	128	256
4	4	2.000	128	256
TOTAL	16	8.000	128	1.024

a) Linhagem S-6 FRI: produtora de enterotoxina SEB.

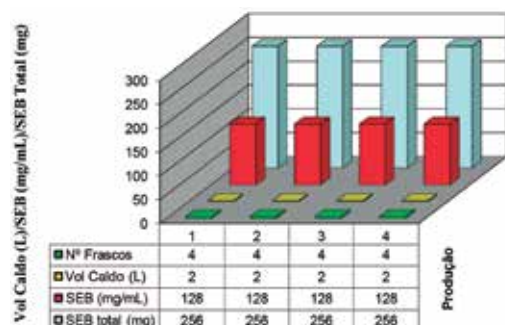
b) Frasco de Fehrembach de 2.800 mL, 280 rpm, com 500 mL de meio.

c) Meio TELK: triptona 4%, extrato de levedura 1% e K_2HPO_4 0,1%.

d) A concentração de enterotoxina foi determinada por (OSP) imunodifusão em gel.

e) Inóculo de 5 mL (10^8 ufc/mL), por frasco.

Gráfico 2: Produção de enterotoxina SEB com cultivo em frasco sob agitação com o meio TELK e inóculo de 5 mL (10⁸ ufc/mL).



Foram utilizados 2.000mL de “crude” que continham 300 mg de enterotoxina, produzidos com o meio triptona 4%, extrato de levedura 0,1% e fosfato de potássio 0,1%, com o método do frasco sob agitação com a linhagem FRI – S 6. O “crude”, após ter o pH ajustado para 5,6, com HCl 5 mol/L, foi diluído dez vezes com água destilada e adicionado de 150 mL de resina CG-50. No cultivo em frasco de Fehrenbach sob agitação, o crescimento celular ocorre diretamente no meio de cultura, tornando o “crude” mais denso e com maior quantidade de resíduos de meio de cultura, sendo por isso diluído dez vezes.

3.3 Purificação da enterotoxina SEB com CG – 50 e Red – Dye Ligant Resin

3.3.1 Extração tipo “batch” da enterotoxina SEB com a resina CG – 50

Foram utilizados 2.000 mL de “crude” que continham 300 mg de enterotoxina, produzidos com o meio triptona 4%, extrato de levedura 0,1% e fosfato de potássio 0,1%, com o método do frasco sob agitação com a linhagem FRI – S 6. O “crude”, após ter o pH ajustado para 5,6, com HCl 5 mol/L, foi diluído dez vezes com água destilada e adicionado de 150 mL de resina CG-50. No cultivo em frasco de Fehrenbach sob agitação, o crescimento celular ocorre diretamente no meio de cultura, tornando o “crude” mais denso e com maior quantidade de resíduos de meio de cultura, sendo por isso diluído dez vezes.

Na extração da enterotoxina SEB do “crude” foi usada também uma cromatografia tipo “batch” com uma resina CG-50. A extração da enterotoxina com 150 mL de resina para 2.000 mL de “crude” com 300 mg de enterotoxina mostrou-se bastante eficiente, considerando a quantidade de enterotoxina recuperada, isto é, 292 mg, correspondendo a 97,3%. Dos 300 mg aplicados, 2,7 mg não foram eluídos, e 5,8 mg não foram adsorvidos pela resina, conforme mostrado na TAB. 4 e no GRAF. 2. Os presentes resultados podem considerados excelentes.

Tabela 4: Extração de enterotoxina SEB do “crude” com resina CG-50^(a) e eluída com tampão PBS^(b)

EXTRAÇÃO / ELUIÇÃO	QUANTIDADE ^(c) ELUÍDA mg/100 mL	TOTAL DE SEB P/ ELUIÇÃO (mg)	PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO P/ EXTRAÇÃO	TOTAL NÃO RECUPERADO (mg)
1 ^a	80.000	80	26,7	
2 ^a	80.000	80	26,7	
3 ^a	60.000	60	20,0	
4 ^a	40.000	40	13,3	
5 ^a	16.000	16	5,3	8,0

6 ^a	10.000	10	3,3
7 ^a	4.000	4	1,3
8 ^a	2.000	2	0,7
9 ^a	-	-	-
10 ^a	-	-	-
TOTAL	292.000	292	97,3
			2,7

- Resina de troca iônica usada na purificação de proteínas básicas.
- Tampão de eluição PBS 0,5 mol/L, pH 6.2.
- Cálculo feito por OSP.

Figura 5A: Cromatografia de SEB em uma coluna de Red-A-Gel (2,1 cm x 40 cm) lavada com tampão KHPO₄ 0,05 mol/L, pH 6.8. Uma amostra de 100 mL de eluído preparado conforme citado no item anterior, com 138 mg de SEB, foi aplicada na coluna com um fluxo de 85 mL/h, a bomba ajustada para 3x10, e o volume das frações, para 15mL. A coluna foi lavada *overnight* com tampão 0,05 mol/L, com a bomba ajustada para 2, e o registrador, para 2. A SEB foi eluída com tampão KHPO₄ 0,015 mol/L, pH 6.8. A maior quantidade foi detectada nas frações do pico “B” 90 mg, nas frações do pico “A” 720 mg e nas frações do pico “C” 360 mg.

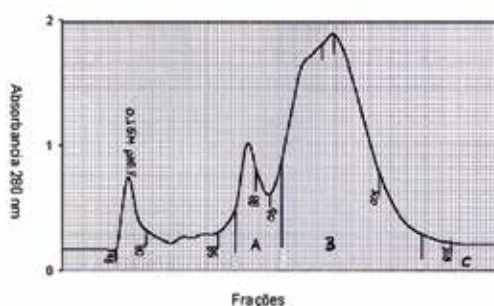
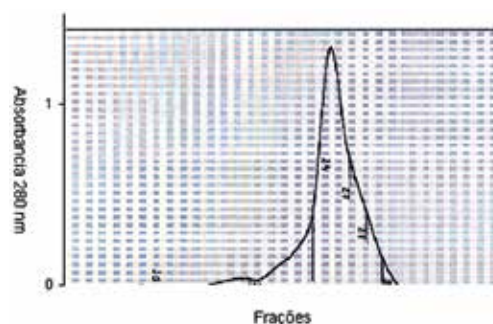


Figura 5B: Cromatografia de SEB em uma coluna de Sephacryl S-200 (2,1 cm x 117 cm) lavada com KHPO₄ 0,05 mol/L, pH 6.8, adicionado de NaCl 0,5 mol/L. Um frasco total de 90 mg de SEB liofilizado e referente ao pico B da etapa anterior foi dissolvido em 2 mL de tampão KHPO₄ de equilíbrio, centrifugada e, em seguida, aplicada na coluna de Sephacryl. A coluna foi corrida com o tampão KHPO₄ 0,05 mol/L, a bomba ajustada para 2,5, o volume das frações para 15 ml, e o registrador ajustado para 0,5.

As frações 24 a 29 foram combinadas e dializadas com tampão NaHPO₄, 0,05 mol/L, pH 6.8. A leitura no espectrofotômetro a 278 nm indicou 78,8 mg de SEB.



4 Produção de enterotoxina SEC₂

4.1 Reativação do microrganismo

A linhagem produtora de SEC₂ utilizada nesse experimento foi a 361, também preservada em cápsula de porcelana, segundo Hunt *et al.* (1958), conforme mostrado na FIG. 1; dependendo das condições de crescimento e incubação, podem ser produzidos entre 100 µg/mL e 130 µg/mL de enterotoxina, conforme apresentado na TAB. 5.

4.2 Produção de enterotoxina SEC₂ com cultivo em frasco de Fehrenbach sob agitação, com o meio TELK

Neste trabalho, foi utilizado um meio à base de triptona 4%, enriquecido com extrato de levedura 1% e fosfato de potássio 0,1%, usando quatro frascos Fehrenbach por

produção, sendo obtidas quatro produções com média de 256mg, perfazendo um total de 1024 mg nas quatro produções. Meio a base de triptona 4% enriquecido com extrato de levedura 1% e fosfato de potássio 0,1%, em quatro repetições com média de 128 µg/mL e 256 mg por repetição perfazendo um total de 1024 mg nas quatro repetições. Em pesquisa anterior CARMO (1997), testando

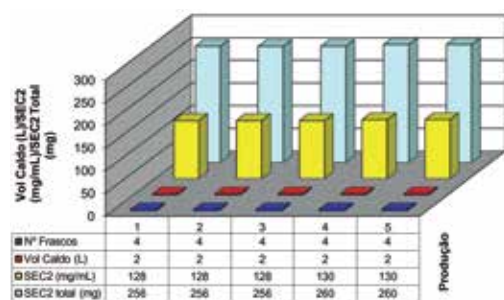
diferentes hidrolizados de caseína, verificou que a triptona adicionada de extrato de levedura demonstrou melhor desempenho na produção de SEB, obtendo uma média de 194 mg/repetição e que a adição do potássio melhorou significativamente a produção. Neste experimento, a média em quatro repetições foi de 256 mg, resultado excelente e bem superior aos obtidos por Robbins *et al.* (1974).

Tabela 5: Produção de enterotoxina SEC₂^(a) com cultivo em frasco^(b) sob agitação com o meio TELK^(c)

PROD. Nº	Nº DE FRASCOS P/ PRODUÇÃO	VOL. DE CALDO P/ PROD. (mL)	SEC ₂ (MÉDIA/mg/mL)(d)	SEC ₂ tOTAL P/ PROD. (mg)
1	4	2.000	128	256
2	4	2.000	128	256
3	4	2.000	128	256
4	4	2.000	130	260
5	4	2.000	130	260
TOTAL	20	10.000	128,8	1.288

- Linhagem 361 FRI: produtora de enterotoxina SEC₂.
- Frasco de Fehrenbach de 2800 mL, 280 rpm, com 500 mL de meio.
- Meio TELK: tryptone 4%, extrato de levedura 1% e K₂H PO₄ 0,1%.
- A concentração de enterotoxina foi determinada por imunodifusão em gel (OSP).
- Inóculo de 5 mL (10⁸ ufc/mL), por frasco.**

Gráfico 3: Produção de enterotoxina SEC₂ com cultivo em frasco sob agitação com o meio TELK e inóculo de 5 mL (10⁸ ufc/mL)



Na TAB. 5 e no GRAF. 3 estão representados os resultados da produção de SEC₂ com o meio a base de triptona 4%, extrato de levedura 1% e fosfato de potássio 0,1%, com cultivo em frasco sob agitação em

cinco repetições com média de 128,8 µg/mL e média de 257,6 mg/repetição. As primeiras produções de SEC₂ em nosso laboratório foram feitas com meios à base de hidrolizados de caseína enriquecidos com extrato de levedura, utilizando o método de cultivo em frasco sob agitação, com excelentes resultados, embora variassem de um meio para outro Carmo (1997).

Entre os hidrolizados de caseína testados, a triptona enriquecida com extrato de levedura e potássio teve o melhor desempenho. Nesse experimento, isso ficou evidenciado, já que foram produzidos, em cinco repetições, 1.288 mg de enterotoxina, com média de 128,8 µg/mL, correspondendo a 257,6 mg/repetição, resultados superiores aos de Robbins *et al.* (1974), utilizando o

caldo BHI com cultivo em frasco sob agitação, obtendo 72 µg/mL e, com o método de membrana sobre ágar, 140 µg/mL.

Embora o método de membrana sobre ágar, tenha apresentado resultado semelhante ao presente, um fato deve ser considerado, ou seja, o rendimento dos dois métodos em termos de volume de sobrenadante e a quantidade de enterotoxina produzida, enquanto no primeiro são produzidos 3,0ml de sobrenadante por placa, no frasco sob agitação, são produzidos 500 mL de sobrenadante por frasco. Calculando o volume de enterotoxina produzida nos dois métodos, no primeiro foram produzidos 420 µg em 3,0 mL de sobrenadante, e no segundo, 64,4 mg em 500 mL de sobrenadante, consequentemente, os presentes resultados foram bem superiores.

Robbins *et al.* (1974) compararam quatro métodos na produção de enterotoxinas com os meios 3 + 3 e o caldo BHI em dupla concentração e concluíram que o cultivo em frasco com tubo de diálise (DONNELLY *et al.*, 1967) foi superior na produção de todas as enterotoxinas, e na produção de SEC₂ foi obtida a média, em cinco repetições de 200 µg. Resultado semelhante foi conseguido em nosso laboratório, em experimento anterior com cultivo com tubo de diálise, cuja metodologia permite a produção de enterotoxina mais concentrada, porém em pequeno volume. Para a produção em maior escala de enterotoxina para fins de purificação, dependendo da enterotoxina e da linhagem, normalmente são utilizados fermentadores ou frasco sob agitação, o que permite usar volumes maiores de caldo.

Em nosso trabalho, preferimos adotar na produção de SEC₂ o cultivo em frasco de Fehrenbach de 2.800 mL sob agitação, pela simplicidade, volume de caldo por frasco 500 mL; normalmente são usados quatro frascos por produção, perfazendo um total de 2.000 mL por produção e pela capacidade produtiva da linhagem FRI -361 neste método, conforme ficou evidenciado com os presentes resultados, reservando os tubos de diálise para a produção de SEA e SED que dependem,

para serem produzidas, das condições em que ocorre o crescimento bacteriano.

Figura 6A: Cromatografia de SEC₂ em uma coluna de Red-A-Gel (2,1 cm x 45 cm) lavada com tampão, KHPO₄ 0,01 mol/L, pH 6.5. Uma amostra de 100 ml de eluído que continha 56 mg de enterotoxina SEC₂ foi aplicada na coluna com um fluxo de 85 mL/h, bomba ajustada para 3x10, e o volume de frações, para 15 mL. A coluna foi lavada com tampão 0,1 e eluída com tampão KHPO₄, 0,15 mol/L, pH 6.8, com a bomba ajustada para 2, e o registrador, para 0,2. A maior parte de SEC₂ foi detectada nas frações do pico "C" 42,5 mg, 45 mg nas frações do pico "A" e 360 mg nas frações do pico "B".

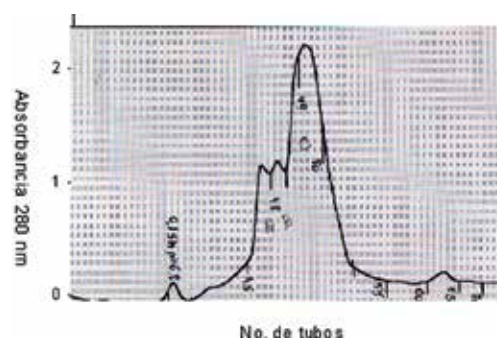


Figura 6B: Cromatografia de SEC₂ em uma coluna de Sephacryl S-200 (2,1 cm x 117 cm) lavada com KHPO₄, 0,05 mol/L, pH 6.8, adicionada de NaCl 0,5 mol/L. Um frasco que continha 42,5 mg SEC₂ purificada referente ao pico "C" foi dissolvido em 2 mL de tampão KHPO₄, centrifugado e, em seguida, aplicado na coluna de Sephacryl. A coluna foi corrida com o tampão 0,05 mol/L, a bomba ajustada para 2,5 e frações de 15 mL, e o registrador ajustado para 0,5. As frações 22 a 25, totalizando 60 mL, foram combinadas e dializadas com tampão NaHPO₄, 0,05 mol/L, pH 6.8. A leitura no espectrofotômetro a 278 nm indicou 37,2 mg.

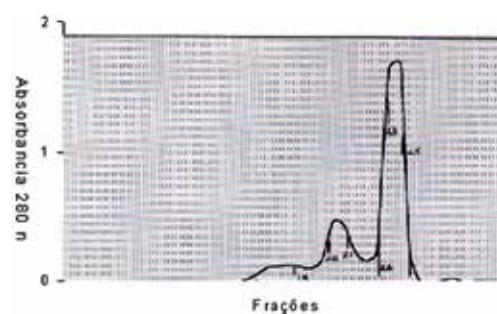
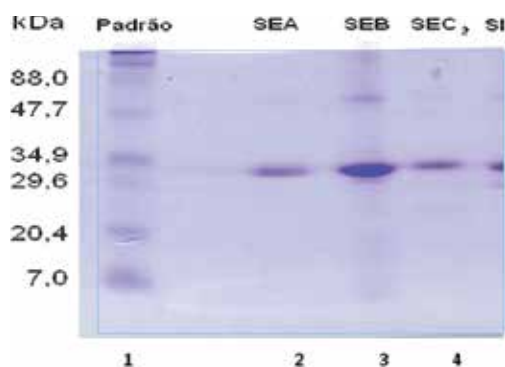


FIGURA 7: SDS page mostrando as enterotoxinas: SEA, SEB, SEC₂ purificadas. Linha 1 marcadores moleculares para SDS Page – Blue (Sigma Corp. St. Louis) 5µL. Corrida por 50 minutos em (Mini – Protean II – Biorad: mod. 1000/500).



Conclusões

Na produção das enterotoxinas, foram utilizadas três linhagens de *Staphylococcus aureus* produtores, respectivamente, das enterotoxinas SEA, SEB, SEC₂, e dois métodos diferentes de fermentação. Na produção da enterotoxina SEA, foi usada a linhagem FRI-722 produtora de “SEA,” com o método do tubo de diálise. Essa linhagem é mutante, desenvolvida a partir de uma cepa selvagem para produzir maiores quantidades de enterotoxina. Para manter a viabilidade e a enterotoxigenicidade da linhagem em longo prazo, essa foi aderida em cápsulas de porcelana e, em curto prazo, em tubos com ágar inclinado, inoculado imediatamente após a reativação, mantendo os tubos na geladeira, em um prazo não superior a cinco dias, evitando-se, assim, a perda da mutagenese e o retorno da linhagem ao estado selvagem.

Para a produção das enterotoxinas SEB e SEC₂, foram utilizadas as linhagens FRI S-6, produtora de SEB, e FRI 361, produtora de SEC₂, isoladas de surtos de toxi-infecção alimentar e capazes de produzir grandes volumes de toxina. A manutenção das linhagens utilizadas na produção das enterotoxinas, aderidas em cápsula de porcelana, mostrou-se satisfatória. A adição do extrato de levedura aos meios proporcionou

aumento acentuado na produção das enterotoxinas. De modo geral, a adição do íon K⁺ melhorou ainda mais o desempenho dos meios à base de triptona e do caldo infuso de cérebro e coração de boi.

Na produção de “SEB” e “SEC₂”, os melhores resultados foram obtidos com o meio à base de triptona enriquecidos com extrato de levedura e íon potássio, com cultivo em frasco sob agitação; embora o método do cultivo em frasco com tubo de diálise tenha dado bons resultados, optou-se pelo frasco sob agitação, em razão do maior volume de enterotoxina produzido. A melhor produção de “SEA” foi obtida com o caldo infuso de cérebro e coração de boi enriquecido com extrato de levedura e íon potássio com cultivo em frasco com tubo de diálise. O uso de cromatografia de troca iônica tipo *batch* com a resina CG-50 para extração das enterotoxinas do “crude” mostrou-se eficiente, com um percentual de recuperação de 77,5% para “SEA”, 97,3% para “SEB”, 97,0% para “SEC₂”.

A utilização de uma resina de afinidade com o corante Red-A-Dye Ligant Resin para obtenção das enterotoxinas com maior grau de pureza mostrou-se excelente, conforme mostrado no gel (FIG. 7). As enterotoxinas e os antissoros específicos, produzidos pelo nosso laboratório, estão sendo usados na rotina da FUNED e dos laboratórios da rede OFICIAL, na identificação de linhagens de estafilococos enterotoxigênicos de alimentos e surtos de toxi-infecção alimentar. ■

Referências

- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989.
- BERGDOLL, M. S.; H. SUGIYAMA; G. M. DACK. The recovery of staphylococcal enterotoxin from bacterial culture supernatants by ion exchange. **J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.**, v. 3, 41-50, 1961.
- BERGDOLL, M. S. *et al.* The toxic shock syndrome toxin-1 and toxin shock syndrome Stuttgart: In: **The Staphylococci, Jelfaszewick**,. Gustav Fisher Verlag, 92, 1985.

- BREHM, R. D. *et al.* Large-scale purification of staphylococcal enterotoxins A, B., and C₂ by dye ligand affinity chromatography. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p.1067-1072, 1990.
- CARMO, L. S. *et al.* A case Study of Massive Staphylococcal Food Poisoning. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 1, n. 4, p.241-246, 2004.
- CARMO, L. S. Produção e Purificação das Enterotoxinas Estafilocócicas, SEA, SEB, SEC SED. Belo Horizonte, 1997. 177 f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- CARMO, L. S. Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos. Belo Horizonte. 2001. 254f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Rev. Microbiol.**, v. 21, n. 4, p.320-323, 1990.
- CASMAN, E. P. *et al.* Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **J. Bacteriol.**, v. 94, n. 6, p.1875-1882, 1967.
- DACK, G. M. Staphylococcus enterotoxins: a review. **Jpn J Med Sci Biol**, v. 16, p.1-12, 1963.
- DONNELLY, C. B. *et al.* Sorological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. **Appl. Microbiol.**, v. 15, n. 6, p.1382-1387, 1967.
- GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **Int J Food Microbiol.**, v. 9, n. 4, p.327-360, 1989.
- HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. Staphylococcus aureus: production of extracellular compounds and behaviour in foods a review. **J Food Prot.**; V. 52, n. 4, p.267-282, 1989.
- HUNT, G. A. *et al.* Presevation of cultures by drying on porcelain beads. **J. Bacteriol.**, v. 76, n. 4, p.453-454, 1958.
- REYNOLDS, D. *et al.* Novel Method for Purification of Staphylococcal Enterotoxin A. **Appl Environ Microbiol.**, v. 54, n.7, p.1761-1765, 1988.
- ROBBINS, R. *et al.* Detecting the enterotoxigenity of Staphylococcus aureus strains. **Appl Microbiol.**, v. 28, n. 6, p.946-950, 1974.
- VERAS, J. F. *et al.* A Study of the Enterotoxigenity of coagulase-negative and coagulase-positive Staphylococcal Isolates From outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **Int J Infect Dis.**, v. 12, n. 4, p.410-415, 2008.