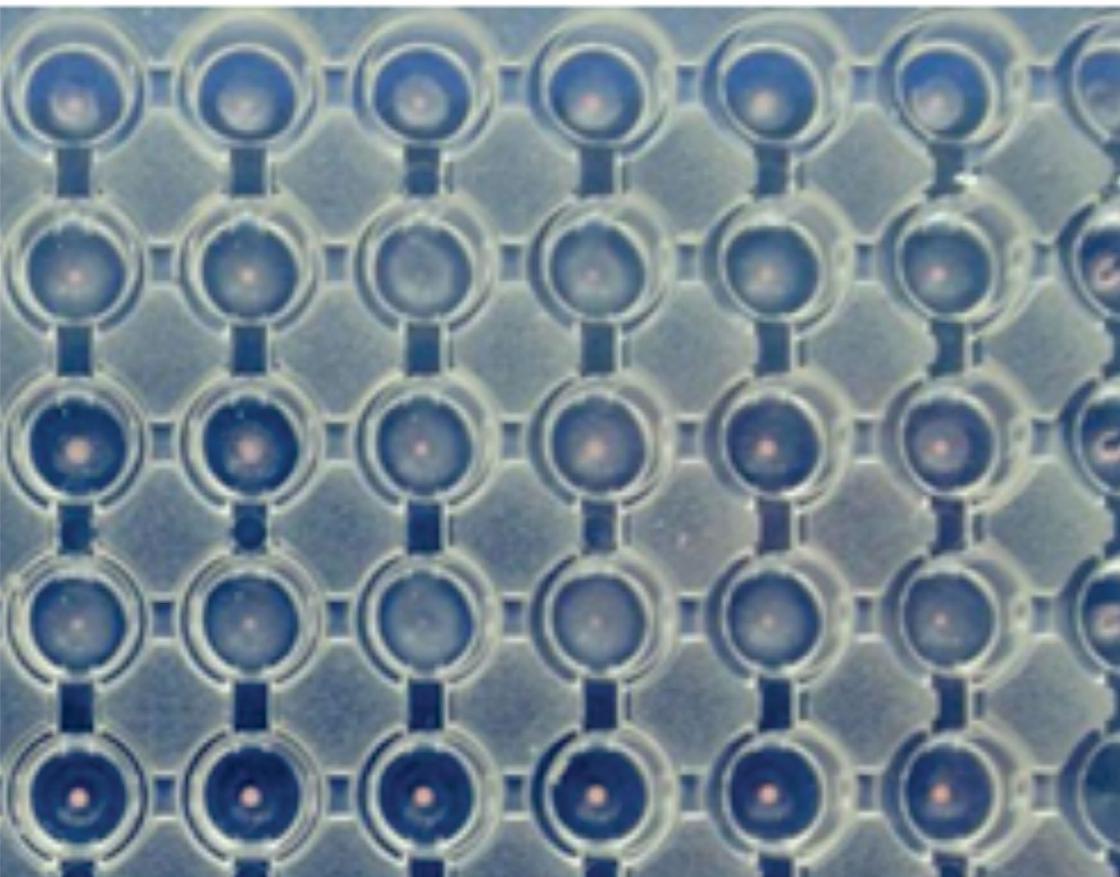


Métodos de Análises Rápidas para Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas em Alimentos



ISSN 2179-8184

Dezembro, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 165

Métodos de Análises Rápidas para Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas em Alimentos

*Maria Gardenny Ribeiro Pimenta-Martins
Maria de Fatima Borges
Roselayne Ferro Furtado
Carlucio Roberto Alves*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2013

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

www.cnpat.embrapa.br

cnpat.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*

Secretário-Executivo: *Marcos Antônio Nakayama*

Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Foto da capa: *Cláudio de Norões Rocha - Placa de imunoensaio por aglutinação de látex*

1ª edição (2013): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Métodos de análises rápidas para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos / Maria Gardenny Ribeiro Pimenta-Martins... [et al.] - Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

20 p. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184 ; 165).

1. Imunossensores eletroquímicos. 2. Levantamento dos métodos imunológicos tradicionais. I. Pimenta-Martins, Maria Gardenny Ribeiro. II. Borges, Maria de Fatima. III. Furtado, Roselayne Ferro. IV. Alves, Carlúcio Roberto. V. Série.

CDD 579.353

© Embrapa 2013

Autores

Maria Gardenny Ribeiro Pimenta Martins

Bióloga, D.Sc. em Biotecnologia, professora da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, gardennyrp@yahoo.com.br

Maria de Fatima Borges

Farmacêutica-bioquímica, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, maria.fatima@embrapa.br

Roselayne Ferro Furtado

Bióloga, D.Sc. em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, roselayne.furtado@embrapa.br

Carlucio Roberto Alves

Químico, D.Sc. em Físico-Química, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, alvescr@yahoo.com

Apresentação

A intoxicação estafilocócica constitui a causa mais frequente de surtos de doenças transmitidas por alimentos. A detecção de enterotoxinas é realizada por meio de ensaios imunológicos, e, recentemente, os métodos envolvendo o uso de biossensores têm ganhado espaço.

Neste documento, são apresentados diferentes métodos imunológicos disponíveis no mercado e métodos baseados em imunossensores para detecção de enterotoxinas estafilocócicas. A análise das vantagens e desvantagens de cada método é importante para o direcionamento de novas pesquisas que possam superar os gargalos metodológicos e subsidiar o desenvolvimento de novas técnicas a partir de conhecimento pré-existente.

A Embrapa Agroindústria Tropical, em parceria com outras instituições de pesquisa e ensino, tem realizado estudos para o desenvolvimento de novos métodos de detecção de enterotoxinas que também estão contemplados neste trabalho. Este documento trata de forma sucinta dos principais métodos rápidos disponíveis comercialmente e as pesquisas promissoras para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.

Cláudio Rogério Bezerra Torres

Chefe-Geral interino da Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Introdução	7
Métodos imunológicos	9
Imunossensores eletroquímicos	12
Considerações finais	15
Referências	17

Métodos de Análises Rápidas para Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas em Alimentos

Maria Gardenny Ribeiro Pimenta-Martins

Maria de Fatima Borges

Roselayne Ferro Furtado

Carlucio Roberto Alves

Introdução

As estratégias de monitoramento e segurança dos alimentos têm sido otimizadas; entretanto, a implantação das tecnologias e protocolos é desigual entre os diversos países, sendo os surtos causados por contaminantes biológicos e químicos cada vez mais frequentes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define doença transmitida por alimento (DTA) como aquela “de natureza infecciosa ou tóxica, causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados” (BRASIL, 2005; WHO, 2007). Há cerca de 250 tipos de DTAs, 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-traço e agrotóxicos) (BRASIL, 2011).

As doenças veiculadas por alimentos, 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 DTAs é esporádica e muitas vezes subnotificadas, porém os surtos de origem alimentar podem assumir grandes proporções (BRASIL, 2005; 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. No Brasil, apenas em 2010, foram reportados por volta de 4,3 bilhões de casos diarreicos agudos, com quase 4 mil mortes (BRASIL, 2012).

Dentre as DTAs, o gênero *Staphylococcus* é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo. Algumas cepas 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). As características clínicas das intoxicações alimentares compreendem sintomas rápidos e agudos como náuseas, vômito, prostração, diarreia, baixa pressão arterial e temperatura corpórea, sem apresentar febre (LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007). Os sintomas aparecem cerca de 2 a 8 horas após ingestão do alimento contaminado (BALABAN; RASSOLY, 2000). As DTAs causadas por *S. aureus* são classificadas no grupo de risco III (INTERNATIONAL..., 2002), que inclui doenças de perigo moderado, geralmente de curta duração, com sintomas autolimitados e severo desconforto (INTERNATIONAL..., 2002; SILVA et al., 2007).

Assim, a detecção das enterotoxinas estafilocócicas (EEs) é importante na qualidade e segurança dos alimentos. As EEs são rotineiramente detectadas por meio de métodos imunológicos como, por exemplo, ensaio imunoenzimático, imunodifusão, radioimunoensaio e aglutinação passiva em látex (BENNET, 2005; CREMONESI et al., 2005). Recentemente, imunossensores também estão sendo utilizados para detecção das enterotoxinas. Esses dispositivos são uma alternativa de baixo custo, alta reprodutibilidade, alta sensibilidade, rápido tempo de resposta e capacidade de miniaturização (ALEFANTIS et al., 2004; WU et al., 2013). Eles permitem ainda a detecção de um amplo espectro de analitos em matrizes de amostras complexas (RICCI et al., 2007) e são promessas de aplicação em diversas áreas.

O desenvolvimento de métodos rápidos de detecção e quantificação dos contaminantes é de grande importância para a segurança dos alimentos e saúde pública, além de um eficiente mecanismo

de monitoramento exigido no controle de qualidade dos produtos alimentícios. Tendo em vista essas necessidades, o presente trabalho apresenta um levantamento dos métodos imunológicos tradicionais e os imunossensores eletroquímicos utilizados na detecção de enterotoxinas estafilocócicas, destacando algumas vantagens e desvantagens de cada método.

Métodos imunológicos

A detecção de contaminantes microbianos por meio de métodos imunológicos tornou-se mais sensível, específica, reprodutível e confiável nos últimos anos. Atualmente, há muitos testes disponíveis no mercado para detecção de vários tipos de microrganismos e seus metabólitos (LEONARD et al., 2003) como, por exemplo, *Escherichia coli* (MAGLIULO et al., 2007), *Salmonella* (WALKER et al., 2001), enterotoxinas estafilocócicas (LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007) e *Listeria monocytogenes* (MAGLIULO et al., 2007).

Os métodos imunológicos baseiam-se na ligação do anticorpo (monoclonal, policlonal ou recombinante) com o antígeno, a fim de obter resultados rápidos e específicos (ZUNABOVIC et al., 2011). Os principais métodos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são baseados em imunoenaios e apresentam diferentes limites de detecção (Tabela 1).

Tabela 1. Limite de detecção (LD) de métodos analíticos de detecção das enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.

Método analítico	LD ⁽¹⁾	Referência
Ensaio imunoenzimático	0,1 ng mL ⁻¹	Vernozy-Rozand et al. (2004); Yang et al. (2008)
Western blotting	0,1 ng mL ⁻¹	Rasooly e Rasooly (1999)
Imunodifusão em ágar	0,1 µg mL ⁻¹	Ler et al. (2006)
Radioimunoensaio	1 ng mL ⁻¹	Ler et al. (2006)
Aglutinação em látex	1 ng mL ⁻¹	Wong e Bergdoll (2002)

⁽¹⁾Limite de detecção para as enterotoxinas A e B.

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.

Outro método importante para análise de proteínas ainda utilizado é o Western Blotting, que permite a discriminação de reações cruzadas de proteínas heterólogas. Esse método tem vantagens sobre o Elisa em análise de alimentos, pois, durante o processamento da amostra, podem aparecer agregados de proteínas que são solubilizados e separados no gel de SDS-PAGE.

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.

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.

No método de aglutinação em látex, o anticorpo é marcado com partículas de látex que, com a interação antígeno-anticorpo, formam perceptíveis grumos. Esse método, assim como o radioimunoensaio, tem uma sensibilidade menor na detecção das enterotoxinas.

No mercado, podem ser encontrados diferentes tipos de kits comerciais para detecção das enterotoxinas estafilocócicas baseados nos métodos imunológicos explícitos anteriormente. Os kits mais utilizados em análises de alimentos estão descritos na Tabela 2.

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 (PARK et al., 1993, VELUSAMY et al., 2010, ROSENGREN et al., 2010; SOSPEDRA et al., 2013).

Tabela 2. Relação dos kits imunológicos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.

Kit	Método	Fabricante
SET-RPLA®	Aglutinação em látex de fase reversa	Denka Seiken (Tóquio, Japão)
SET-EIA®	Imunoenzimático por absorvância	Toxin Technology (Sarasota, Estados Unidos)
TECRA®	Imunoenzimático por absorvância	Bioenterprises (Roseville, Austrália)
ELFA-SET®	Imunoenzimático por fluorescência	BioMérieux AS (Marcy-l'Etoile, França)
TRANSIA PLATE®	Imunoenzimático por absorvância	Diffchamb (Västra Frolunda, Suécia)
RIDASCREEN SET®	Imunoenzimático por absorvância	Biopharm GmbH (Darmstadt, Alemanha)
VIDAS SET®	Imunoenzimático por absorvância	BioMérieux AS (Marcy-l'Etoile, França)

Todos esses testes imunológicos são semiquantitativos. Embora sejam práticos e precisos, eles apresentam algumas desvantagens, como, por exemplo, as reações cruzadas, que tanto podem ocorrer com antígenos não específicos como com peróxidos endógenos de determinados alimentos. Tais interferentes podem não ser identificados em um resultado positivo. Por outro lado, alimentos processados com calor contêm enterotoxinas que podem apresentar resultado negativo, pois os agregados proteicos reduzem a reatividade com anticorpos (MENG; DOYLE, 2002).

A reação cruzada é um problema inerente aos diversos tipos de testes imunológicos, porque os anticorpos podem reconhecer apenas pequenas regiões das proteínas, e epítomos similares podem ocorrer em outras proteínas (SOSPEDRA et al., 2013), condição que pode gerar resultados falso-positivos. Uma nova geração de teste de detecção de enterotoxinas estafilocócicas usa apenas os fragmentos Fab (região variável do anticorpo responsável pelo reconhecimento do antígeno) na construção do anticorpo conjugado (TECHER et al., 2013).

A remoção do fragmento Fc (região constante do anticorpo com atividade biológica importante no controle da infecção) reduz a interferência com as matrizes alimentares e ligações inespecíficas a outras proteínas, evitando falso-positivos e melhorando a especificidade. Além disso, o emprego direto dos fragmentos Fab otimizam o posicionamento do anticorpo e o reconhecimento do antígeno, conferindo melhor sensibilidade.

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. Ressalta-se que a sensibilidade dos métodos ópticos segue a lei de Lambert-Beer, segundo a qual o volume da amostra e o comprimento de onda são requeridos para otimizar o desempenho do teste (RICCI et al., 2012).

Imunossensores eletroquímicos

Na perspectiva de novos métodos analíticos para análise da qualidade de alimentos, os biossensores eletroquímicos surgem como uma alternativa promissora, com a proposta de detecção rápida, de baixo custo e alta sensibilidade (WU et al., 2013). Os biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos que convertem uma resposta biológica em sinal elétrico (JIANG et al., 2008; GRIESHABER et al., 2008), sendo constituídos por dois componentes principais: a) o biorreceptor, que reconhece o analito alvo; b) transdutor, que converte o reconhecimento em um sinal elétrico mensurável (GOODING, 2006).

Os imunossensores são um tipo de biossensor que usa anticorpos (Ac) como elementos sensores ou antígenos (Ag) para detecção de anticorpo como molécula de reconhecimento do sensor (MARQUETTE; BLUM, 2006; JIANG et al., 2008). Em imunossensores eletroquímicos, após a formação da superfície de reconhecimento, o anticorpo marcado (Ac-conjugado) reage diretamente com o Ag ou com complexo Ag-Ac de interesse imobilizado na superfície (Figura 1). O sinal é reconhecido com o uso de um instrumento portátil ou de bancada, aplicando as diferentes técnicas eletroquímicas (RUAN et al., 2004; RICCI et al., 2012; WU et al., 2013).

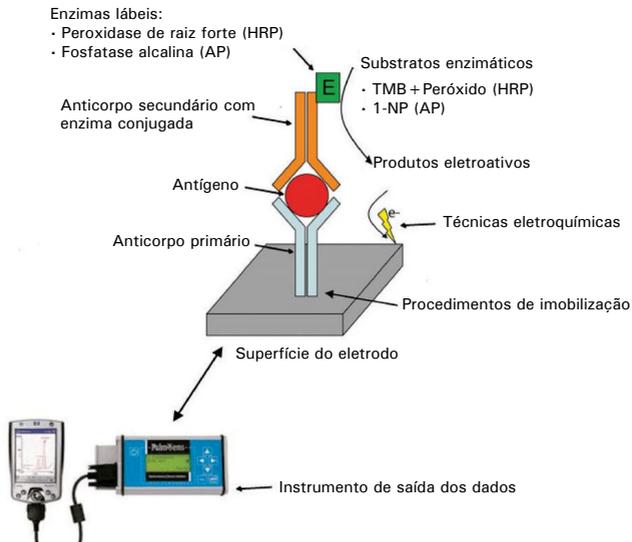


Figura 1. Componentes de um imunossensor eletroquímico utilizando anticorpos como molécula de reconhecimento.

Fonte: Adaptada de WU et al. (2013).

Os imunossensores são mais versáteis que os biossensores enzimáticos, pois podem ser aplicados para detecção de uma variedade maior de moléculas. A interação Ag-Ac é específica e similar à ligação chave-fechadura, ou seja, os anticorpos reconhecem epítomos específicos do antígeno (VO-DINH; CULLUM, 2000). Muitos

imunossensores estão sendo desenvolvidos para detecção de um analito (monocanal) ou vários (multicanal) em alimentos e bebidas, como os produtos lácteos, por exemplo. Wu et al. (2013) apresentaram um imunossensor eletroquímico baseado em magnetossomos para detecção de enterotoxina estafilocócica B (EEB). O dispositivo detectou em três amostras de leite cru a concentração de $0,37 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,16 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,69 \text{ ng mL}^{-1}$, porém a EEB não foi detectada em leite esterilizado pelo dispositivo. Os resultados obtidos na avaliação do imunossensor apresentou boa repetibilidade e desvio padrão de 5,02% na detecção de 1 ng mL^{-1} de EEB ($n = 9$).

Outro estudo desenvolveu um imunossensor amperométrico para detecção de enterotoxina estafilocócica A (EEA), com limite de detecção de $33,9 \text{ ng mL}^{-1}$ ($n = 3$) e comportamento reprodutível com desvio padrão de 8,3% para detecção de 1 mg mL^{-1} de EEA. O funcionamento do imunossensor foi testado em amostras de queijo coalho de fabricação artesanal (Figura 2), avaliando a capacidade de detectar a presença da EEA em amostras contaminadas e não contaminadas (PIMENTA-MARTINS et al., 2012).

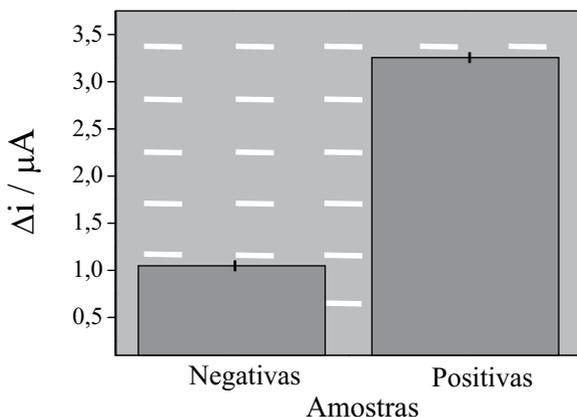


Figura 2. Avaliação do imunossensor em amostras contaminadas e não contaminadas de queijo coalho. Resposta do imunossensor em solução de PBS pH 7,4 contendo $60 \mu\text{M}$ de hidroquinona e $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 . $E = -35 \text{ mV}$.

Fonte: Pimenta-Martins et al. (2012).

Uma característica importante na confecção de um imunossensor é a homologia entre as cadeias das enterotoxinas, que pode chegar a 80% e é usada como base para classificá-las em dois grupos (LE LOIR et al., 2003). O primeiro grupo compreende as enterotoxinas (A, E e D) e exotoxina pirogênica estreptocócica C (SPEC), com uma homologia em suas cadeias de aminoácidos variando entre 51% e 81%. O segundo grupo abrange as enterotoxinas (C e B) e exotoxina pirogênica estreptocócica A (SPEA), com uma sequência homóloga de 42% a 67% (BALABAN; RASSOLY, 2000). As similaridades entre as cadeias pode ser uma das causas de reações cruzadas para as diferentes enterotoxinas, assim como acontece nos kits imunológicos.

Por isso, testes de seletividade são importantes no desenvolvimento de um imunossensor, sobretudo para identificar a existência de reações cruzadas na amostra de alimento. Um estudo realizado na confecção de imunossensor para EEB proposto por Lin e Tsai (2003) mostrou reação cruzada de 18% para EEC e 6,4% para EEA, não produzindo sinal algum para EED. Esse estudo corrobora o trabalho de Pimenta-Martins et al. (2012), cujos resultados das reações cruzadas da EEA com EEB, EEC e EED foram de 7,2%, 28,6% e 30,5%, respectivamente. Ambos os estudos comprovam o grau de similaridade entre os grupos das enterotoxinas estafilocócicas e a necessidade de uma avaliação bem criteriosa na confecção de um teste de diagnóstico incluindo estudos comparativos de especificidade de biomoléculas. Algumas medidas podem ser adotadas para minimizar as respostas falso-positivas, a começar pela escolha do material biológico. Nesse caso, os anticorpos monoclonais e recombinantes são preferíveis em razão da alta especificidade e da adoção de alguns procedimentos de tratamento da amostra.

Considerações finais

Em razão da resposta rápida e alta sensibilidade, os métodos rápidos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são ferramentas preferíveis a métodos convencionais na análise de qualidade de alimentos. Além disso, os kits comerciais baseados em princípios

imunológicos geralmente têm custo elevado por análise e podem apresentar reações cruzadas.

O uso de imunossensores eletroquímicos vem se destacando como método de análise para detecção de enterotoxinas estafilocócicas, apresentando elevada sensibilidade e especificidade na detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. Contudo, assim como foi destacado para os kits comerciais, os fatores que propiciam as reações cruzadas nos imunossensores também devem ser minimizados. Esses dispositivos são uma alternativa promissora como ferramenta de monitoramento de qualidade e segurança de alimentos, principalmente na inspeção de produtos artesanais, devido à praticidade de manuseio.

Referências

ALEFANTIS, T.; GREWAL, P.; ASHTON, J.; KHAN, A. S.; VALDES, J. J.; DEL VECCHIO, V. G. A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-through put screening. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 18, n. 6, p. 379-382, 2004.

BALABAN, N.; RASSOLY, A. Staphylococcal enterotoxin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BENETT, R. W. Staphylococcal enterotoxina and its rapid identification in food by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 6, p.1264-1270, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças transmitidas por alimentos. **Situação epidemiológica, 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550>. Acesso em: 25 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças diarreicas agudas. **Situação epidemiológica, 2012**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549>. Acesso em: 25 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, n. 6, 2005. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 25 ago. 2013.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains

isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.19, n. 5, p. 299-305, 2005.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxin of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

GOODING, J. J. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: recent progress and future trends. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 559, n. 2, p. 137-151, 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in food 7: microbiological testing for the microbiological specifications of foods**. New York: Hardcover, 2002. 262 p.

JIANG, X.; LI, D.; XU, X.; YING, Y.; LI, Y.; YE, Z.; WANG, J. Immunosensors for detection of pesticide residues. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 23, n. 11, p. 1577-1587, 2008.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; PIEKARSKA, K.; GROCHOWSKA, A.; WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 319-323, 2007.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, n.1, p. 63-76, 2003.

LEONARD, P.; HEARTY, S.; BRENNAN, J.; DUNNE, L.; QUINN, J.; CHAKRABORTY, T.; O'KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 1, p. 3-13, 2003.

LER, S. G.; LEE, F. K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Trends in detection of warfare agents. Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin C and T-2 toxin. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1133, n. 1-2, p. 1-12, 2006.

LIN, H.; TSAI, A. J. Food-borne illnesses. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 18, p. 1479-1483, 2003.

MAGLIULO, M.; SIMONI, P.; GUARDIGLI, M.; MICHELINI, E.; LUCIANI, M.; LELLI, R. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 13, p. 4933-4939, 2007.

MARQUETTE, C. A.; BLUM, L. J. State of the art and advances in immunoanalytical systems. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 21, n. 8, p. 1424-1433, 2006.

MENG, J. H.; DOYLE, M. P. Introduction. Microbiological food safety. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n. 4, p. 395-397, 2002.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Simple solution to false positive staphylococcal enterotoxins assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 7, p. 2210-2213, 1993.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R.; FURTADO, R. F.; HENEINE, L. G. D.; DIAS, R. S.; BORGES, M. F.; ALVES, C. R. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, n.1, p. 138-143, 2012.

RASOOLY, L.; RASSOLY, A. Real time biosensor analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 119-127, 1999.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, New York, v. 84, p. 74-83, 2012.

RICCI, F.; VOLPE, G.; MICHELI, L.; PALLESCI, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 605, n. 2, p. 111-129, 2007.

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of Staphylococcus aureus in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 2, p. 263-269, 2010.

RUAN, C.; ZENG, K.; VARGHESE, O. K.; GRIMES, C. A. A staphylococcal enterotoxin B magnetoelastic immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 20, n. 3, p. 585-591, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise de microbiologia de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SOSPEDRA, I.; SORIANO, J. M.; MAÑES, J. Enterotoxinomics: The omic sciences in the study of staphylococcal toxins analyzed in food matrices. **Food Research International**, Barking, v. 54, n. 1, p. 1052-1060, 2013.

TECHER, C.; SALMAIN, M.; TRANQUET, O.; ECHASSERIEAU, V.; LE MOIGNE, V.; HENNEKINNE, J.-A.; GAUTIER, M.; VAL, F. Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. **Food Control**, Guildford, v. 32, n. 1, p. 225-261, 2013.

- VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, K. O.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 2, p. 232-254, 2010.
- VERAS, J. F.; DO CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; DOS SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. 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, 2008.
- VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BAVAI, C.; RICHARD, Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letter Applied Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 490-495, 2004.
- VO-DINH, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' Journal Analytical Chemistry**, Berlin, v. 366, n. 6-7, p. 540-550, 2000.
- WALKER, R. L.; KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for Salmonella detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 123-129, 2001.
- WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D. O.; RIE-MANN, H.P. **Foodborne diseases**. 2. ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. p. 321-248.
- WHO. World Health Organization. **Food safety and foodborne illness**, n. 237, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>>. Acesso em: 22 set. 2013.
- WU, L.; GAO, B.; ZHANG, F.; SUN, X.; ZHANG, Y.; LI, Z. A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. **Talanta**, Oxford, v. 106, p. 360-366, 2013.
- YANG, M.; KOSTOV, Y.; RASOOLY, A. Carbon nanotubes based optical immunodetection of Staphylococcal Enterotoxin B(SEB) in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 78-83, 2008.
- ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 2, p. 351-362, 2011.



Agroindústria Tropical

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

