

Caracterização de grupos *agr* I, II, III e IV em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Tipo Minas Frescal em Viçosa, MG¹

Milena Tomasi Bassani²; Mauricéia Greici de Oliveira³; Gabriela Viçosa Nogueira⁴; Luís Augusto Nero⁴; Wladimir Padilha da Silva⁵

Introdução

Em muitos países a intoxicação alimentar estafilocócica é a causa mais freqüente de surtos de doenças microbianas transmitidas pela ingestão de alimentos. Dentre os alimentos capazes de causar esse tipo de intoxicação, o leite e seus derivados são os maiores envolvidos nos surtos (Le Loir, et al., 2003).

A intoxicação resulta da ingestão de enterotoxinas produzidas por Estafilococos Coagulase Positiva (ECP). A presença de ECP em alimentos pode indicar deficiência de processamento térmico, condições higiênicas inadequadas do processo ou ainda, refrigeração deficiente pós preparo.

Os mecanismos de patogenicidade desse microrganismo ainda não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que estão relacionados a diversas proteínas como adesinas, toxinas e exozimas, que são fortemente reguladas por globais reguladores, durante as fases de crescimento bacteriano (Jarraud et al., 2002). Entre estes, o acessório gene regulador (*agr*) é o regulador melhor estudado e mais bem caracterizado. É composto de 5 genes (*hld*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), dois promotores (P2 e P3) e uma molécula efetora (RNAlII). São conhecidos quatro distintos grupos *agr*: I, II, III e IV, todos determinados pelo polimorfismo da seqüência de aminoácido de *AgrD* e *AgrC*.

Mutações naturais em cepas de *S. aureus* que causem deleções no locus *agr*, reduzem a persistência de infecções, diminuem a síntese de exotoxinas, reduzem a capacidade de aderência e promovem decréscimo do crescimento intracelular, sugerindo que *agr*, por si só, é um importante fator de virulência (Jarraud et al., 2002).

Neste contexto, objetivou-se identificar, através da técnica de PCR, a presença dos grupos *agr* I, II, III e IV em cepas de *S. aureus* isoladas de queijo Tipo Minas Frescal na cidade de Viçosa, MG.

Metodologia

Foram utilizadas 30 cepas de *S. aureus* provenientes de queijo Tipo Minas Frescal, provenientes da coleção de culturas do laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Universidade Federal de Viçosa.

As cepas de referência utilizadas foram *S. aureus* RN 6390B, USA 100, RN 8846 e RN 4850 - *agr* I, *agr* II, *agr* III e *agr* IV, respectivamente.

¹Projeto Caracterização de grupos *agr*, perfil antimicrobiano e enterotoxigênico em *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos e leite de vacas mastíticas. Projeto financiado pelo CAPES

²Doutoranda do Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial E-mail: mtbassani@yahoo.com.br

³Mestranda do Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. E-mail:greici_sel@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Viçosa. E-mail: nero@ufv.br

⁵Professor Doutor do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/UFPEL E-mail: silvawp@ufpel.edu.br

Para detecção dos grupos *agr* foi realizada a extração do DNA de acordo com protocolo proposto por MATTHEWS et al. (1997). Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos esperados de 440pb para *agr I* e 572pb para *agr II*, 406pb para *agr III* e 588 para *agr IV*, foram os descritos por SHOPSIN et al. (2003).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com corante GEL RED, e visualizado sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Resultados e Discussão

Das 30 cepas de *S. aureus* isoladas de queijo Tipo Minas Frescal, somente três apresentavam perfil de bandas compatível com algum dos grupos *agr*, sendo duas pertencentes ao grupo *agr II* e uma ao grupo *agr I* (Fig 1). Esse resultado é interessante, haja vista que Jarraud et al. (2002) observaram que cepas causadoras de doenças mediadas por enterotoxinas pertenciam, principalmente, aos grupos *agr I* e *II*.

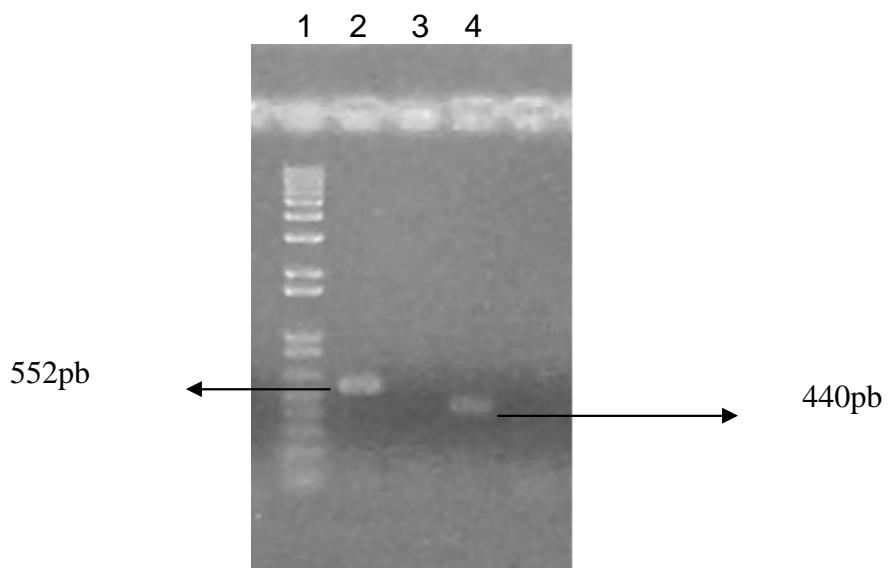


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,2% de produtos de PCR realizada com DNA de cepas padrão de *S. aureus* – Colunas 1: Marcador de massa molecular DNA Ladder 1kb plus (Invitrogen®); Coluna 2: fragmento do grupo *agr II* (552pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* USA 100; Coluna 3: controle negativo da reação Coluna 4:fragmento do grupo *agr I* (440pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN6390B;

A detecção do grupo *agr* em 3 cepas de *S. aureus* não significa a confirmação da presença de toxinas estafilocócicas no queijo tipo Minas Frescal, mas ressalta a importância de investigação, já que algumas enterotoxinas são reguladas pelo *agr* (Le Loir, et al., 2003). Dessa forma, mesmo não havendo dados sobre a presença de genes das enterotoxinas nas cepas avaliadas, a prevalência dos grupos *agr I* e *II* e a associação com as enterotoxinas, demonstrada por Jarraud et al. (2002), aponta para um possível potencial enterotoxigênico dessas cepas.

Autores como Ayed et al. (2006) mencionam a associação de grupos *agr* a um clone específico ou a um grupo clonal, o que poderia explicar a maior prevalência do grupo *agr* II em isolados de queijo Tipo Minas Frescal.

Vautor et al (2007), indicam a possibilidade de ligação entre a origem genética e o grupo *agr*, depois de encontrarem o grupo *agr* III em 80% dos isolados de leite de casos de mastite em ovelhas no sul da França.

Conclusões

Três cepas de *S. aureus* isoladas em queijo Tipo Minas Frescal em Viçosa, MG, apresentavam perfil de bandas compatível com algum dos grupos *agr*, sendo duas pertencentes ao grupo *agr* II e uma ao grupo *agr* I.

Agradecimentos

A CAPES pelo financiamento do projeto de pesquisa, e a Dra. Agnes de Sá (Universidade Federal do Rio de Janeiro) pelo fornecimento das cepas padrão de *agr*.

Referências

- AYED S., BOUTIBA-BEN BOUBAKER I.; SAMIR E., BEN REDJEB S. Prevalence of *agr* specificity groups among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. **Pathologie Biologie** v.54, p.435–438, 2006
- JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631-641, 2002.
- LE LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** v. 2, p. 63-76, 2003.
- MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S. P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.60, p.686-688, 1997.
- SHOPSIN, B. et al. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 456-459, 2003.
- VAUTOR E.; CARSENTI-DELLAMONICA H., SABAH M., MANCINI G.; PÉPIN M.; DELLAMONICA P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v.72, p. 197–199, 2007.