



PRESENÇA DO *cluster egc* E IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS *agr* I e II EM CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DE CARÇAÇA DE FRANGO

BASSANI, Milena Tomasi,¹ ZOCHE, Fernando¹, BASTOS, Caroline Peixoto¹, SILVA, Wladimir Padilha¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

1-mtbassani@yahoo.com.br silvawp@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é considerada a terceira causa mais importante de doença alimentar no mundo. A habilidade desse microrganismo em crescer e produzir enterotoxinas sob várias condições é evidenciada pela variedade de alimentos implicados em intoxicação alimentar (MORANDI et al., 2007).

A causa da intoxicação alimentar é a ingestão de enterotoxinas (EE) pré-formadas no alimento (BALABAN et al., 2000), das quais, cinco são consideradas clássicas (EEA até EEE), e muitas EE novas, como as enterotoxinas do *cluster egc* (EEG, EEI, EEM, EEN e EEO), têm sido reportadas (DINGES et al., 2000).

Os genes do *cluster egc* estão organizados em um *operon*, constituído por dois genes de enterotoxinas (*seg* e *sei*), três genes de enterotoxina-like com comprovada atividade superantigênica, mas não com propriedades eméticas (*selo*, *selm* e *seln*), e dois pseudogenes (*Ψent 1* e *2*). Esta organização sugere que o *cluster egc* pode ter surgido por duplicação de genes ou variação de um gene ancestral, criando dessa forma recombinação de genes com atividade biológica diferentes (BLAIOTTA et al. 2004).

A regulação de fatores de virulência, como as EE, é crítica para a patogenicidade dos microrganismos. Em *S. aureus*, diversos reguladores globais têm sido citados, como é o caso do gene acessório regulador (*agr*) e do *Staphylococcal* acessório regulador (*sar*) (TSENG et al., 2004).

O *locus agr* consiste de 5 genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *hld*), codificados por 2 divergentes transcriptores (RNAII e RNAIII) e iniciado por 2 distintos promotores (P2 e P3) (GOERK et al., 2003). O polimorfismo em *agrD* e *agrC* distingue quatro grupos (I a IV) de *S. aureus*. Em geral, *agr* mutantes resultam em aumento da produção de proteínas de parede, decréscimo da produção de exoproteínas e redução na virulência (YOO et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo identificar, por PCR, os grupos *agr* I e II, além de detectar o *cluster egc* em cepas de *S. aureus* provenientes de carcaças de frango.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O isolamento e a identificação das 14 cepas de *S. aureus* provenientes de carcaças de frango foram realizados de acordo com LANCETTE e BENNETT (2001). As cepas de referência utilizadas foram *S. aureus* FRI361, *S. aureus* FRI472, *S. aureus* RN6390B (grupo *agr* I) e *S. aureus* USA 100 (grupo *agr* II).

Para detecção dos genes do *cluster egc* e dos grupos *agr* foi realizada, primeiramente, a extração do DNA de acordo com protocolo proposto por MATTHEWS et al. (1997). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação parcial do *cluster egc* (*sei1* e *seg2*), produzindo fragmento esperado de 3375bp, foram os descritos por BLAIOTTA et al. (2004), e para a amplificação dos fragmentos esperados de 440pb para *agr* I e 572pb para *agr* II, foram os descritos por SHOPSIN et al. (2003).

Para confirmação da adequada amplificação do fragmento de 3375pb, os produtos de PCR foram purificados por *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences®) e digeridos com *EcoRI* e *HindIII*. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e comparados com o marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®).

Os produtos de PCR, para identificação dos grupos *agr*, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e visualizado sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oligonucleotídeos iniciadores *sei1* e *seg2* foram específicos para o fragmento de 3375pb do *cluster egc*, o que foi comprovado pela digestão dos produtos de PCR com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, obtendo-se fragmentos de 1654pb, 1085pb e 636pb, conforme descrito por JARRAUD et al. (2001) e BLAIOTTA et al. (2004). Os fragmentos gerados com as PCR e após a digestão podem ser observados na Figura 1A.

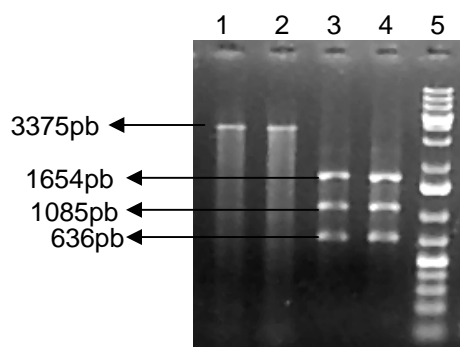


FIGURA 1A: Eletroforese em gel de agarose 1%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* e oligonucleotídeos iniciadores *sei1* e *seg2*. – Colunas 1 e 2: fragmento do *cluster egc* (3375pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361 e de DNA de *S. aureus* FRI472, respectivamente; Colunas 3 e 4: Fragmentos do *cluster egc* obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361 e de DNA de *S. aureus* FRI472, respectivamente, digeridos com *EcoRI* e *HindIII*; Coluna 5: Marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®).

Os fragmentos esperados de 440pb para *agr I* e 572pb para *agr II* nas cepas padrão *S. aureus* RN6390B (grupo *agr I*) e *S. aureus* USA 100 (grupo *agr II*), podem ser observados na Figura 1B.

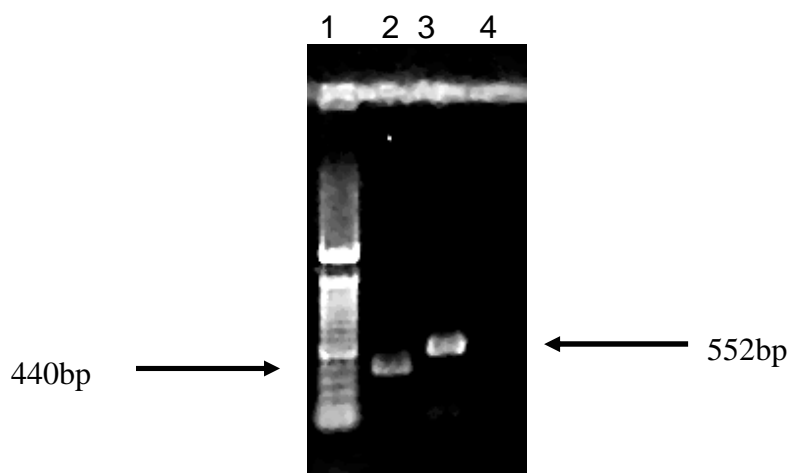


FIGURA 1B: Eletroforese em gel de agarose 1%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* e oligonucleotídeos iniciadores. – Colunas 1: Marcador de massa molecular DNA *Ladder* 100pb (Invitrogen®); Coluna 2: fragmento do grupo *agr I* (440pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN6390B; Coluna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

Observou-se que das 14 cepas isoladas de carcaça de frango, 64,2% (9/14) portavam o *cluster egc*. Além disso, 13 pertenciam ao grupo *agr II* e uma pertencia ao grupo *agr I*.

Autores como SMYTH et al. (2005), avaliaram 15 cepas de *S. aureus* oriundas de frango, e encontraram que 86,7% das cepas portavam os genes do *cluster egc*. Já HWANG et al. (2007), caracterizaram molecularmente 87 cepas de *S. aureus* isoladas desse mesmo alimento e observaram que 36,9% possuíam esse agrupamento completo.

Não houve relação entre a presença do *cluster egc* com determinado grupo *agr*, resultados também observados por JARRAUD et al. (2002). Já, JI et al. (1997), associaram a síndrome do choque tóxico com cepas pertencentes ao grupo *agr III* e SAKOULAS et al. (2002), associaram reduzida susceptibilidade à vancomicina, com cepas *agr I* e II.

4. CONCLUSÕES

Observou-se elevada presença do *cluster egc* e do grupo *agr II* em *S. aureus* isolados de frangos.

5. REFERÊNCIAS

- BALABAN, N.; RASSOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BLAIOTTA, G.; *et al.* PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.
- DINGES, M.; ORWIN, P.M.; SCHEIVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 16-34, 2000.
- GOERK, C.; KÜMMEL, M.; DIETZ, K.; WOLZ, C. Evaluation of intraspecies interference due to *agr* polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. **The Journal Infectious Diseases**, v. 188, p. 250 – 256, 2003.
- HWANG, S. Y.; *et al.* Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 99–105, 2007.
- JARRAUD, S.; *et al.* *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.
- JARRAUD, S. *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 631-641, 2002.
- LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.
- 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.
- MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66-72, 2007.
- SAKOULAS, G, *et al.* *S. aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) Group II: Is There a Relationship to the Development of Intermediate-Level Glycopeptide Resistance? **The Journal Infectious Diseases**, v. 187, p.929 – 938, 2003
- 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.
- SMYTH, D. S.; *et al.* Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 401-411, 2005.
- TSENG, C. W.; ZHANG, S.; STEWART, G. Accessory Gene Regulator Control of Staphylococcal Enterotoxin D Gene Expression. **Journal of Bacteriology**. v. 186, n. 6, p. 1793-1801, 2004.
- YOON, H. J.; CHOI, J. Y.; LEE, K.; YONG, D.; KIM, J. M.; SONG, Y. G. Accessory Gene Regulator Group Polymorphisms in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Association with Clinical Significance. **Yonsei Medical Journal**, v.48, p.176-183, 2007.