

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR



DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum* POR  
MEIO DE RAPD, SEQÜENCIAMENTO DE GENES DE  
PATOGENICIDADE E ARDRA

**Ana Carolina Santini**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Maio de 2007**

Ana Carolina Santini

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum* POR  
MEIO DE RAPD, SEQÜENCIAMENTO DE GENES DE  
PATOGENICIDADE E ARDRA

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Maio de 2007**

ANA CAROLINA SANTINI

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum* POR  
MEIO DE RAPD, SEQÜENCIAMENTO DE GENES DE  
PATOGENICIDADE E ARDRA

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

APROVADA: 28 de maio de 2007

Prof. Dr. Marcos Lázaro Moreli  
UESC

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo  
UFMG

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa  
UESC – Orientador

Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo  
UESC – Co-orientador

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho ao meu grande amigo, irmão e companheiro, Rodrigo Augusto Santini, que está sempre comigo a cada riso e a cada lágrima, brindando à vida e ao nosso amor!

Aos meus pais, Elba Maria Nonato Santini e Valter Santini, que são os co-responsáveis pelo meu sucesso!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela vida, pela família linda que Ele me concedeu, por todo o aprendizado que já tive, por todas as minhas realizações e pela oportunidade de estar concluindo mais uma etapa nessa longa estrada de realização profissional.

À minha mãe, por me arrastar até à escola nos dias que eu chorava e fazia manha para ficar em casa. Assim aprendi o significado da palavra “disciplina”. Por me ajudar nos momentos mais difíceis. Por rezar por mim nos momentos em que eu chorava de desespero, achando que nada fosse dar certo. Por preparar comidas deliciosas e levar para mim nos árduos dias de escrita em que eu não saía do computador. Por eu ter engordurado todo o teclado do notebook dela e ela não ter ficado brava.

Ao meu pai, que sempre ria dizendo que todas as notas abaixo de dez são baixas. Com isso aprendi a superar meus próprios limites. Por todo o carinho que ele sempre está disposto a me oferecer, tentando me fazer rir nos momentos em que o estresse chega ao limite. Por acordar bem cedo e me levar de carro pra Universidade nos dias em que eu estava mais cansada. Por entrar dez vezes por dia no escritório só para me dar um beijo e perguntar se estava tudo bem, quando eu me isolava do mundo escrevendo. Por deixar de fazer diversas ligações importantes enquanto eu usava a internet discada para pesquisa.

Ao Rô, meu irmão e melhor amigo, quem está sempre ao meu lado, me fazendo feliz o tempo todo. Agradeço por ele existir. Por ser um grande companheiro, por me levar pra passear e dar risada nos momentos em que o cansaço físico e mental chegava ao limite. Por assumir algumas

responsabilidades minhas quando eu estava sobrecarregada. Por me buscar na Universidade às 23h45 e em outros horários malucos de hora extra no laboratório. Pelo amor que ele me oferece todos os dias.

Ao meu orientador Ronan Xavier Corrêa, um profissional que eu tanto admiro, por todo o apoio que me ofereceu desde o dia em que recebi o aceite de orientação. Por ter me ajudado a estudar para a prova do mestrado. Por toda a paciência que teve comigo ao longo do trabalho e toda a compreensão com as minhas limitações. Por me receber diversas vezes em sua sala entre seus milhares de compromissos, mesmo sem horário marcado, tirando todas as minhas dúvidas e dando o suporte necessário. Por permitir que eu caminhasse sozinha nos momentos que assim desejei.

Ao co-orientador Júlio César de Mattos Cascardo, pelas diversas colaborações, principalmente nas etapas laboratoriais. Por ter resolvido de modo simples e rápido, problemas que para mim pareciam verdadeiros bichos de sete cabeças.

À colaboradora Juliana Teixeira de Magalhães, pela idealização deste projeto, o primeiro com *Chromobacterium violaceum* no mestrado da UESC. Por ter me auxiliado tanto, principalmente nas fases iniciais do trabalho. Pela grande colaboração, mesmo após sua ida para a França, por meio de mensagens eletrônicas.

Aos colegas do mestrado e do laboratório, em especial àqueles que tanto me ajudaram diretamente na execução deste trabalho: Robson, que realizou os seqüenciamentos; Stênio e Cristiano, por todo o auxílio no laboratório; Fabrício, pela ajuda na análise dos dados; Duda, tanto pelo auxílio no laboratório de genética quanto no laboratório de informática; Verônica, pela amizade e por trabalhar comigo na parte microbiológica com todo critério e organização que só ela tem; Tharcilla, por nossa linda amizade, por sempre me socorrer quando preciso, por sempre oferecer carinho e atenção, e principalmente, por me ensinar a ter fé e a acreditar na minha capacidade.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo curso oferecido.

À FAPESB, pela concessão da bolsa.

Ao PADCT/CNPq, pelo auxílio financeiro ao projeto.

## ÍNDICE

<b>EXTRATO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	3
2.2. Aspectos clínicos .....	5
2.3. Projeto genoma .....	9
2.4. Ilhas de patogenicidade .....	11
2.5. Métodos de biologia molecular para estudo de diversidade .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. Obtenção das linhagens .....	15
3.2. Estoque .....	16
3.3. Extração de DNA .....	16
3.4. Reação RAPD .....	17
3.5. Reação em cadeia da polimerase dos genes <i>hila</i> e <i>yscD</i> .....	17
3.6. Seqüenciamento dos produtos de PCR .....	18
3.7. ARDRA .....	19
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
4.1. Diversidade genética das linhagens pela técnica de RAPD .....	20
4.2. Reação em cadeia da polimerase dos genes <i>hila</i> e <i>yscD</i> .....	22
4.4. Seqüenciamento dos produtos de PCR do gene <i>hila</i> .....	24
4.4. Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado .....	26
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>3</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>

## EXTRATO

SANTINI, Ana Carolina, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, maio de 2007. **Diversidade genética e caracterização de genes de patogenicidade em diferentes isolados de *Chromobacterium violaceum***. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientador: Júlio César de Mattos Cascardo. Colaboradora: Juliana Teixeira de Magalhães.

O *Chromobacterium violaceum* é um bacilo Gram-negativo comumente encontrado em águas e solos de ambientes de clima tropical, principalmente no rio Negro e às suas margens. Infecções em humanos causadas por este microorganismo ocorrem com baixa frequência, no entanto, trata-se de uma infecção de rápida disseminação e elevada taxa de mortalidade. O seqüenciamento do genoma da *Chromobacterium violaceum* demonstrou a presença de ORFs que codificam componentes TTSS (*type III secretory system*) estritamente envolvidos com o mecanismo de infecção. O presente trabalho visou detectar variabilidade genética entre os diferentes isolados de *Chromobacterium violaceum* por meio das técnicas de RAPD, PCR, seqüenciamento e análise de rDNA 16S. Foram isoladas nove linhagens de *C. violaceum*, sendo uma a linhagem-tipo ATCC12472, uma patogênica, duas isoladas da água e cinco do solo. Inicialmente foram realizadas reações RAPD com o intuito de observar diferenças mais abrangentes no genoma. Procedeu-se com PCR utilizando *primers* específicos para genes de patogenicidade e seqüenciando os produtos amplificados. Para uma abordagem mais específica da filogenia deste microorganismo, o produto de PCR do gene 16S foi tratado com endonucleases de

restrição. As análises com os dados RAPD indicaram ampla diversidade entre as linhagens. Todas elas amplificaram com o par de *primers hila* e sete foram seqüenciadas. Já com o par de *primers yscD*, apenas o controle positivo (ATCC 12472) amplificou. Pela análise de restrição do rDNA 16S, não foram identificados polimorfismos entre os isolados. Tal como esperado, os dados RAPDs demonstraram-se mais variáveis, os genes de patogenicidade mediamente variáveis, enquanto o rDNA 16S menos variáveis.

**Palavras-chave:** PCR, RAPD, polimorfismo, ilhas de patogenicidade, 16S.

## ABSTRACT

SANTINI, Ana Carolina, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, May, 2007. **Genetic diversity of *Chromobacterium violaceum* by using RAPD, sequencing of pathogenicity genes and ARDRA.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Advisory Committee Members: Júlio César de Mattos Cascardo and Juliana Teixeira de Magalhães.

*Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative bacillus usually found in water and soil in tropical regions, especially in Negro river and in its banks. Although infections in humans caused by this organism occur with low frequency, it is characterized by rapid dissemination and high mortality. The sequencing of the *Chromobacterium violaceum* genome revealed ORFs coding for TTSS componets (*type III secretory system*) strictly involved with pathogenesis mechanism. This work aimed to detect genetic variability between different isolates of *Chromobacterium violaceum* by using RAPD, PCR, sequencing and rDNA 16S analysis. Nine strains were isolated: one was type-strain ATCC 12472, one pathogenic, two from water and five from soil. Initially, reactions RAPD were performed with the intention to observe wide differences in the genome. It proceeded with PCR using specific primers for pathogenicity genes and sequencing the amplified products. For a more specific approach of the phylogeny of this microorganism, the PCR products of rDNA 16S were digested with restriction enzymes. The analysis with RAPD data showed wide diversity between the strains. All of them amplified with primers for *hilA* and seven of them were sequenced. Only the positive control (ATCC 12472) amplified with primers for

*yscD*. In the analysis of rDNA 16S, none polymorphisms were observed. As expected, RAPD data were the most variable, pathogenicity genes were medium variable, while rDNA16S were the less variable.

**Key-words:** PCR, RAPD, polymorphism, pathogenicity island, 16S.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria em forma de bacilo Gram-negativo de distribuição mundial e abundantemente encontrada no Rio Negro e às suas margens, na região Amazônica. Seu habitat consiste em águas e solos de ambientes de clima tropical e subtropical (DURÁN et al., 2001; HUNGRIA et al., 2005).

Uma de suas características mais notáveis é a produção de violaceína, um pigmento roxo insolúvel em água e solúvel em etanol, que apresenta diversas propriedades de interesse médico e biotecnológico. Possui atividade antibacteriana, antichagásica, antitumoral, antileishmanial, antiviral, entre outras (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; ANTÔNIO; CRECZYNSKI-PASA, 2004).

A *C. violaceum* tem capacidade de utilizar compostos metálicos. Deste modo, pode ser utilizada na detoxificação do meio ambiente contra resíduos orgânicos, químicos e metais pesados, controlando poluentes que consistem em um problema de saúde pública. Além da biorremediação, este microrganismo pode ser útil no desenvolvimento de produtos de interesse médico, na agricultura, na biossíntese de plásticos biodegradáveis e na solubilização do ouro (CAREPO et al., 2004).

Com base no seu amplo potencial biotecnológico e visando elucidar aspectos relevantes de adaptação ambiental, o *Brazilian National Genome Consortium* seqüenciou o genoma completo deste interessante microrganismo de vida livre. Trata-se de uma bactéria sujeita a alterações de temperatura e pH, exposição a raios UV, metais pesados, antimicrobianos e compostos tóxicos. Desse modo, requer rápida e alta capacidade adaptativa, como demonstrada pelo resultado do seqüenciamento. A *C. violaceum* possui todo um mecanismo molecular estratégico para a imediata transcrição de genes quando necessário, sua respiração é aeróbica facultativa e possui diversas formas de obtenção e armazenamento de energia (CRECZYNSKI-PASA;

ANTÔNIO, 2004; HUNGRIA et al., 2004; SILVA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2003).

Foram encontradas também ORFs que codificam proteínas estritamente envolvidas com a patogenicidade e que estão presentes em outros patógenos humanos, como *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* e *Pseudomonas aeruginosa* (BRITO et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2003)

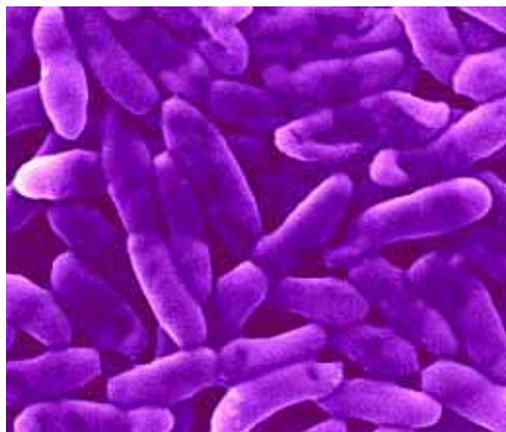
A *C. violaceum*, apesar de sua ampla distribuição mundial, raramente infecta humanos, pois possui baixa virulência. No entanto, quando ocorre, a infecção evolui rapidamente causando lesões na pele, dor abdominal, febre, múltiplos abscessos viscerais, principalmente no fígado, pulmão e baço, choque séptico e óbito. A taxa de mortalidade por cromobacteriose é elevada, chegando a 65% (FELDMAN et al., 1984; KOBURGER; MAY, 1982; LEE et al., 1999; MARTINEZ et al., 2000; RAY et al., 2004; TEOH et al., 2006).

Existe na literatura relato de infecção no município de Ilhéus – BA, acometendo três irmãos após recreação em águas estagnadas, sendo que dois evoluíram para óbito (DIAS et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2005). Considerando que este microrganismo está presente nas águas e no solo da região e trata-se de um problema local, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética e os genes de patogenicidade de diferentes isolados de *C. violaceum* provenientes de solo, água e humano, por meio das técnicas de RAPD, amplificação e seqüenciamento de genes de patogenicidade, bem como por análise de restrição de rDNA 16S amplificado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* é um bacilo Gram-negativo de distribuição mundial comumente isolado do solo e da água em regiões tropicais e sub-tropicais (Figura 1). Suas colônias apresentam coloração violeta devido à produção de pigmento colorido em condições aeróbicas. No entanto, existem tanto linhagens pigmentadas como não pigmentadas. Foi descrita pela primeira vez por Boisbaudran, em 1882, porém a formação de coloração violeta sobre um preparado de farinha havia sido observada 15 anos antes desta publicação. Provavelmente Boisbaudran publicou seu achado motivado pelo trabalho de Gessard, referente à extração de um material azul obtido a partir de certos líquidos patológicos. Na mesma época, em 1880, Bergonzini esqueceu de descartar uma de suas soluções de albumina, utilizada no seu trabalho sobre “o mecanismo de ação das causas que retardam a putrefação” e, um mês depois, encontrou a solução coberta por uma densa película de coloração violeta. Suspeitou inicialmente se tratar de *Chromococcus violaceus*, única bactéria conhecida que apresentava esta coloração. No entanto Bergonzini verificou que o pigmento não se solubilizava em água, concluindo então que estava diante de uma “nova bactéria colorida”, que chamou de *Cromobacterium violaceum*, em 1881. O nome foi corrigido para *Chromobacterium violaceum* no mesmo ano, por Zimmerman (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; HUNGRIA et al., 2005; RETTORI, 2000; DURÁN et al., 2001).



**Figura 1** – Micrografia Eletrônica da *Chromobacterium violaceum*. Foto: Márcia Attias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

No Brasil, a *C. violaceum* foi descoberta quase um século depois. Em abril de 1976, em frente à estação de tratamento de água de Manaus, foi realizada uma coleta a 30 metros de profundidade. Na análise bacteriológica foram observados dois tipos de colônias, brancas e violetas, estas últimas identificadas como *C. violaceum* (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; RETTORI, 2000; DURÁN et al., 2001).

Inicialmente outras espécies produtoras de pigmento pertenciam ao gênero *Chromobacterium*, porém as classificações taxonômicas foram alteradas a partir de novos estudos. A *C. violaceum* pertence à Classe  $\beta$ -Proteobactéria, Ordem Neisseriales, Família Neisseriaceae (BREED, 1948; BRUCKNER, 1999; DUARTE et al., 2004; GILMAN, 1952; HUNGRIA et al., 2005; LEIFSON, 1956; DURÁN et al., 2001).

Uma das características mais notáveis da *Chromobacterium violaceum* é a produção de um pigmento roxo, insolúvel em água e solúvel em etanol, conhecido como violaceína. Desde que foi apresentada a suspeita de que a violaceína seria uma proteção da bactéria contra a irradiação solar, diversos outros estudos evidenciaram o potencial fototerapêutico desse pigmento, bem como suas propriedades antibióticas, farmacológicas e biotecnológicas. A violaceína apresenta atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.*, causas de importantes doenças endêmicas da região Amazônica, onde este bacilo é encontrado em abundância, especialmente nas águas escuras do Rio Negro e à sua margem (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; ANTÔNIO;

CRECZYNSKI-PASA, 2004; CAREPO et al., 2004; DURÁN et al., 2001; HUNGRIA et al., 2005).

O potencial biotecnológico da *C. violaceum* ainda inclui a síntese de bioplásticos (PHAs - polihidroxicarboxilato), celulose e de compostos de relevância médica, além do biocontrole de insetos, fungos e nematódeos. Tem capacidade de utilizar compostos metálicos e desse modo transformar compostos tóxicos em materiais menos tóxicos, podendo ser aplicada biotecnologicamente para a detoxificação ambiental e solubilização do ouro (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; ANTÔNIO; CRECZYNSKI-PASA, 2004; CAREPO et al., 2004; HUNGRIA et al., 2005).

A função fisiológica da violaceína não está bem elucidada. Estudos recentes demonstraram que a atividade respiratória de suspensão de células não pigmentadas se eleva quando a violaceína é adicionada ao meio. Estes resultados sugerem que se trata de um pigmento respiratório. Foi proposto ainda que a violaceína seria um regulador da síntese do triptofano, visto que o mesmo é essencial na síntese deste pigmento e única molécula precursora em sua biossíntese, podendo ser tóxico para a célula em grande quantidade. No entanto, sabe-se que a violaceína não é essencial para a sobrevivência da bactéria, visto que existem tanto colônias pigmentadas como não pigmentadas e, mesmo em linhagens pigmentadas, a síntese de violaceína ocorre somente na presença de oxigênio (DURÁN et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2003).

Além da violaceína, pesquisas recentes confirmam a importância de vários outros metabólitos da *C. violaceum* de interesse biológico e médico (como os potenciadores de antibióticos beta-lactâmicos glicopeptídeos e os antibióticos antitumorais), bem como a relevância de diversas enzimas, muitas das quais ainda não estudadas. Desse modo, cabe destacar a infinidade de estudos a serem realizados sobre este incrível microrganismo (DeMOSS; HAPPEL, 1958; DURÁN et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2003; ZINGER-YOSOVICH et al., 2006).

## **2.2. Aspectos clínicos**

A *C. violaceum* é um organismo de vida livre e normalmente se comporta como saprófita. Contudo, esporadicamente ela se torna um agressivo patógeno humano, sendo mais comum casos de infecção em animais. O potencial patogênico deste

microrganismo foi descrito pela primeira vez em búfalos por Woolley, em 1905. Em humanos, o primeiro relato foi na Malásia, em 1927 e, desde então, outros casos foram reportados em Taiwan, Vietnam, Índia, Japão, Hong Kong, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Austrália, Senegal e Sri Lanka (CHEN et al., 2003; CROSSE et al., 2006; DIAS et al., 2005; LEE et al., 1999; MACHER et al., 1982, MARTIN; BRIMACOMBE, 1992; MARTINEZ et al., 2000; PETRILLO et al., 1984; RAY et al., 2004; SIRINAVIN et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2005; SUAREZ et al., 1986; TEOH et al., 2006; ZINGER-YOSOVICH et al., 2006).

Devido ao seu baixo poder de infecção, este patógeno é considerado de baixa virulência. Os estudos de caso, em sua maior parte, sugerem que as infecções ocorrem em indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças, em especial portadores da doença granulomatosa crônica. Alguns autores acreditam que exista uma predisposição genética ou algum fator familiar, baseados na ocorrência de mais de um caso na mesma família (BROWN et al., 2006; DIAS et al., 2005; MACHER et al., 1982; SIQUEIRA et al., 2005; SIRINAVIN et al., 2005).

O modo de infecção mais freqüente é por meio de ferimentos na pele em contato com solo ou águas contaminadas, principalmente provenientes de chuvas. No entanto, existem relatos de infecção através do olho, cirurgia da mama e ingestão de água após mergulho ou afogamento. Outro possível veículo de transmissão menos comum seriam alimentos contaminados. Estudos demonstraram a presença de *C. violaceum* em vegetais frescos e em frango processado (COX, 1975; FELDMAN et al., 1984; KOBURGER; MAY, 1982; LEE et al., 1999; MARTINEZ et al., 2000; RAY et al., 2004; TEOH et al., 2006).

Os principais sintomas da infecção são: febre, lesões na pele, alterações nas células sangüíneas, dor abdominal, e abscessos no fígado, pulmão, baço e rim. Com menor freqüência, existem relatos de náuseas, vômitos, diarréia, pneumonia, apendicite aguda, palidez, anorexia, cianose, meningite, dor de garganta, cefaléia, dilatação cardíaca e hipertrofia de nódulos linfáticos. A infecção evolui rapidamente, levando à septicemia, falência de múltiplos órgãos e óbito (FELDMAN et al., 1984; KOBURGER; MAY, 1982; LEE et al., 1999; MARTINEZ et al., 2000; RAY et al., 2004; TEOH et al., 2006).

Não obstante a ampla distribuição mundial da *C. violaceum*, o número de relatos de cromobacteriose na literatura chega a pouco mais de 150 casos. No Brasil, até hoje,

existem somente três relatos de infecção, sendo que um deles ocorreu no município de Ilhéus – BA, no qual três irmãos se infectaram após recreação em águas estagnadas em uma área rural do município. Sabe-se que os três irmãos permaneceram horas neste lago com outras crianças e adultos, inclusive seus pais, em um grupo de sessenta pessoas (DIAS et al., 2005; MARTINEZ et al., 2000; PETRILLO et al., 1984; SIQUEIRA et al., 2005).

Três dias após o contato com o lago de águas pluviais, um dos meninos, de 12 anos, apresentou dor de garganta e dor abdominal intensa, e três dias depois foi internado com septicemia. Foram identificadas leucopenia e infiltrado em ambos os pulmões. Os antibióticos utilizados no tratamento não melhoraram o quadro, evoluindo para óbito. Os sintomas de infecção começaram a se manifestar em seu irmão mais velho, de 14 anos, que passou a apresentar cefaléia, febre, vômito e dispnéia. Após internação observou-se leucocitose, elevação de transaminases, hepatomegalia e condensação disseminada em ambos os pulmões. Dois dias depois evoluiu para óbito, visto que os antibióticos de escolha também não foram efetivos. Simultaneamente, o irmão mais novo, de nove anos, foi também internado com dor abdominal, cefaléia, vômitos e múltiplos abscessos pelo corpo. Apresentava leucocitose, hepatomegalia e condensação no hemitórax direito. Os antibióticos foram substituídos e após seis semanas de tratamento, ocorreu alta (DIAS et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2005).

Infecções em humanos são raras, mas geralmente fatais, alcançando taxas de mortalidade que atingem 65%. A evolução da doença é rápida, e com frequência a identificação do microrganismo se dá somente após o óbito. Considerando que a *C. violaceum* apresenta resistência a diversos antibióticos (como penicilina, cefalosporinas e multi-drogas), o tratamento, quando realizado sem o prévio diagnóstico adequado de cromobacteriose com seu respectivo perfil de antibiograma, apresenta-se ineficaz (DIAS et al., 2005; CHEN et al., 2002; FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; MARTINEZ et al., 2000; RAY et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2005; TEOH et al., 2006).

Não está elucidado o motivo pelo qual a infecção não ocorre em todos os casos de exposição. No fim da década de 1970, considerando que todos os casos de cromobacteriose até então relatados eram causados por colônias pigmentadas, levantou-se a suspeita de que somente colônias produtoras de pigmento seriam patogênicas. Foi realizado um estudo comparando a patogenicidade de colônias pigmentadas e não pigmentadas, e verificou-se que ambas apresentavam capacidade

semelhante de causar infecção. A predominância de colônias pigmentadas nos estudos de caso foi atribuída à dificuldade em se identificar o microrganismo quando este não apresenta colônias de coloração violeta. Devido às semelhanças, as colônias não pigmentadas poderiam ser identificadas erroneamente como *Aeromonas sp.* ou *Pseudomonas sp* (SILVENDRA; TAN, 1977; TEOH et al., 2006).

Já no fim da década de 1980, um trabalho comparando linhagens patogênicas com não patogênicas verificou que a linhagem virulenta apresentou-se mais resistente à fagocitose e morte intra-celular por polimorfonucleócitos humanos, o que foi atribuído a diferenças na atividade endotóxica de lipopolissacarídeos, componentes extracelulares ou na produção de outros metabólitos (MILLER et al., 1988).

O diagnóstico de cromobacteriose baseia-se em cultura de amostras de sangue, bem como de fluidos de abscessos ou exudato da pele, seguido de identificação por provas bioquímicas. Como toda análise microbiológica, o processo de identificação é demorado e também difícil, nesse caso especificamente, visto que a *C. violaceum* não é um microrganismo comum na área clínica e sua sintomatologia mimetiza melioidose, causada pelo patógeno *Burkholderia pseudomallei* (CHENG; CURRIE, 2005 HUNGRIA et al., 2005; SCHOLZ et al., 2005a; SCHOLZ et al., 2005b; SILVENDRA; TAN, 1977; TANG et al., 1998; WHITE, 2003).

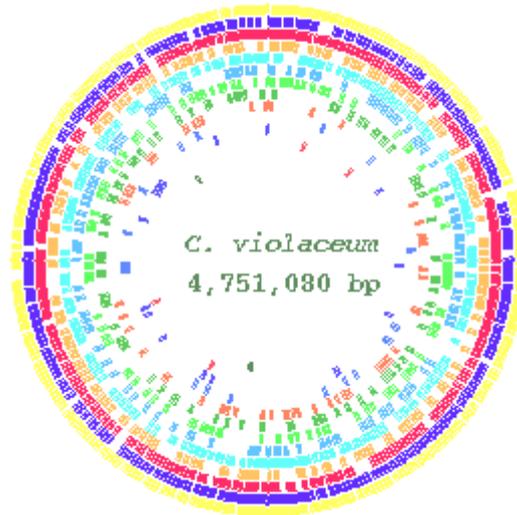
Considerando as características da infecção de rápida disseminação e elevada mortalidade, torna-se relevante a busca por novos métodos diagnósticos que forneçam resultados mais precisos e em menos tempo. Desse modo, pesquisas estão sendo desenvolvidas na área de biologia molecular visando detectar especificamente a *C. violaceum*, bem como diferenciar os isolados. Ensaios de PCR-RFLP com *recA*, um gene conservado que codifica para uma enzima de recombinação, possibilitaram demonstrar que todas as linhagens de *C. violaceum* testadas amplificaram, enquanto as espécies relacionadas não. Além disso, ao clivar o produto de PCR com endonucleases, pôde-se classificar as linhagens em três grupos distintos. Outro ensaio que pode ser considerado como uma potencial ferramenta para diagnóstico é o PCR-multiplex, utilizando como alvo genes de patogenicidade. Foi realizado um trabalho no qual todas as linhagens de *C. violaceum* amplificaram bandas do tamanho esperado, enquanto outras espécies relacionadas apresentaram resultado negativo (HUNGRIA et al., 2005; SCHOLZ et al., 2005a; SCHOLZ et al., 2005b; SILVENDRA; TAN, 1977).

### 2.3. Projeto genoma de *C. violaceum*

O seqüenciamento do genoma da *C. violaceum* (ATCC 12472) pelo *Brazilian National Genome Project Consortium*, em 2003, revelou a complexidade molecular requerida para a versatilidade deste microrganismo. Seu genoma consiste em um único cromossomo circular de 4.751.080 pb, apresentando conteúdo G+C de 64,83% (Figura 2) (VASCONCELOS et al., 2003).

Foram comparadas ORFs da *C. violaceum* com ORFs de outros organismos, encontrando similaridade de 17,4% com *Ralstonia solanacearum*, 9,75% com *Neisseria meningitidis* sorotipo A e 9,61% com *Pseudomonas aeruginosa* (DUARTE et al., 2004; SALANOUBAT et al., 2002; SILVA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2003; ZINGER-YOSOVICH et al., 2006)

*R. solanacearum* é um fitopatógeno de distribuição global, utilizado como sistema modelo dos mecanismos moleculares que determinam a patogenicidade. Metade das ORFs encontradas na *C. violaceum* similares à *R. solanacearum* estão ausentes na *N. meningitidis*, que consiste num patógeno humano. Este fato indica predominância dessas ORFs em microrganismos de vida livre e sugere que elas estejam diretamente relacionadas com a interação com o meio ambiente. As ORFs similares entre *N. meningitidis* e *C. violaceum* são encontradas nos quatro organismos e referem-se a regiões mais conservadas. Ambas são semelhantes também no que se refere à expressão de genes (SALANOUBAT et al., 2002; SILVA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2003; ZINGER-YOSOVICH et al., 2006).



**Figura 2** – Mapa do genoma completo da *C. violaceum*. Fonte: <http://www.brgene.Incc.br/cviolaceum>

Organismos de vida livre estão sujeitos a condições adversas como mudanças de temperatura e pH, exposição a raios UV, metais pesados, antimicrobianos e compostos tóxicos. Sobreviver a essas alterações ambientais requer rápida mudança adaptativa, o que é conferida pela ativação transcricional de genes específicos na *C. violaceum*. O seqüenciamento do seu genoma demonstrou alta porcentagem de ORFs para mecanismo de transdução de sinal (6,4%) quando comparado com outros microrganismos de vida livre já seqüenciados. As ORFs que codificam para proteínas regulatórias transcricionais estão presentes em proporção semelhantes àqueles microrganismos versáteis, capazes de colonizar solo, água, planta e tecido animal, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (DUARTE et al., 2004; HUNGRIA et al., 2004; HUNGRIA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2003).

A *C. violaceum* é capaz de crescer em meio mínimo, na presença de açúcares simples, pois possui um aparato eficiente para a produção de energia. Seu metabolismo sintetiza os 20 aminoácidos, porém o mais notável é o triptofano, envolvido na produção de violaceína em condições aeróbicas. Apresenta rota para a síntese de abrangente quantidade de vitaminas e co-fatores, além de polissacarídeos complexos como a celulose, porém não o glicogênio. É capaz de sintetizar e degradar diversos lipídeos para suplemento energético, formação de membrana e estoque de energia. Por apresentar meios alternativos de obtenção de energia, além de respiração

aeróbica e anaeróbica, esta bactéria sobrevive sob diversas condições ambientais (BAZYLINSKI et al., 1986; CRECZYNSKI-PASA; ANTÔNIO, 2004; DeMOSS; HAPPEL, 1959; HUNGRIA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2003).

Outra característica notável da *C. violaceum* é a resistência a diversos tipos de antibióticos. A análise de similaridade das ORFs revelou um amplo número de seqüências referentes a genes de resistência conhecidos, entre eles os relacionados à resistência a beta-lactâmicos e multi-drogas. Como descrito em diversos estudos de caso, as análises de antibiograma demonstraram que a *C. violaceum* é resistente à penicilina, ampicilina e às cefalosporinas. Os principais antibióticos de escolha para o tratamento da cromobacteriose são a ciprofloxacina e o meropenem. Outros antibióticos que levaram a resultados satisfatórios *in vitro* foram: norfloxacin, pefloxacin, imipenem, cloranfenicol, eritromicina, trimetropim-sulfametoxazol, cefepime, ofloxacin, tetraciclina e os aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina. Foi descrita sensibilidade também à mezlocilina, apesar de ser uma penicilina semi-sintética. Já em relação ao antibiótico piperacilina, existem relatos na literatura tanto de sensibilidade quanto de resistência (DIAS et al., 2005; CHEN et al., 2002; FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; LEE et al., 1999; MARTINEZ et al., 2000; RAY et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2005; TEOH et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2003).

#### **2.4. Ilhas de patogenicidade**

Pesquisas realizadas nas duas últimas décadas demonstram que, ao contrário do que se acreditava, as bactérias Gram-negativas são capazes de transferir proteínas para o meio extracelular e que realizam isto por meio de sistemas de secreção. O sistema de secreção tipo III (TTSS – *type three secretory system*) é um aparato sofisticado que une secreção e patogênese. Algumas dessas proteínas secretadas são efetoras, que são liberadas no citosol da célula alvo, enquanto outras são translocadoras, ou seja, auxiliam as efetoras a atravessarem pela membrana da célula eucariótica (CORNELIS, 2000; HUECK, 1998).

O estudo de genes envolvidos com a síntese de fatores TTSS demonstrou grandes semelhanças entre patógenos humanos e fitopatógenos. Para os patógenos

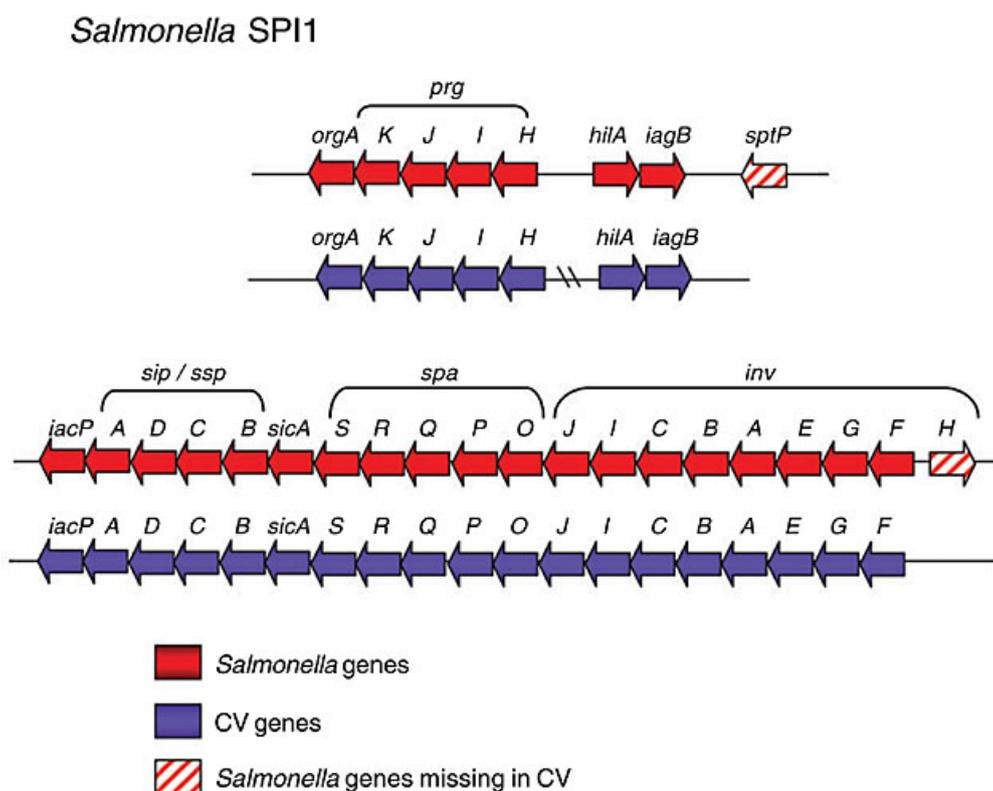
animais, este sistema permite a injeção de suas proteínas através da membrana plasmática ao aderir à superfície da célula hospedeira. No processo de infecção em plantas, as proteínas que participam da rota do TTSS desempenham um papel fundamental, encaminhando os produtos dos genes de avirulência para o interior da célula hospedeira, por mecanismo semelhante a uma seringa, e permitindo que a mesma reconheça essas proteínas através do produto de seus genes de resistência (CORNELIS, 2000; HUECK, 1998; KIM et al., 2003).

A partir da análise molecular de fatores de virulência, foi possível verificar que genes de patogenicidade específicos compõem a diferença crucial entre patógenos e não patógenos, e que grande parte dos mesmos estão organizados em ilhas de patogenicidade (PAIs). Tratam-se de segmentos de DNA de 10 a 200 kb presentes no genoma de linhagens patogênicas, porém ausentes nos membros não patogênicos da mesma espécie ou espécie relacionada. Estes elementos genéticos possuem freqüentemente características em comum: (i) apresentam conteúdo G+C que difere do resto do genoma; (ii) são flanqueadas por pequenas seqüências repetidas diretamente; (iii) estão associadas a genes tRNA; (iv) carregam genes críticos ou funcionais que codificam fatores tais como integrases, transposases e elementos IS (*insertion sequence*) ou parte desses elementos; e (v) são instáveis (COLLYN et al., 2004; CORNELIS, 2000; HUECK, 1998).

As características das PAIs indicam que as mesmas realizam excisão e inserção sítio específica e que possivelmente sofreram transmissão horizontal. Isto é evidenciado, na prática, por microrganismos distantes que apresentam um sistema de secreção tipo III bem conservado, enquanto suas proteínas secretadas diferem completamente (CORNELIS, 2000; HUECK, 1998).

O seqüenciamento do genoma da *C. violaceum* demonstrou a presença de diversos genes envolvidos com adesão e invasão à célula hospedeira, bem como sistemas de transporte para fatores de virulência. Além disso, identificaram-se genes responsáveis pela biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS) e proteoglicanos, que agem como indutores de citocinas pró-inflamatórias entre outras proteínas de fase inflamatória aguda. Sabe-se que a ativação excessiva do sistema imune é um importante mecanismo envolvido na infecção sistêmica de bactérias Gram-negativas e na síndrome do choque séptico (BRITO et al., 2004; MILLER et al., 1988; VASCONCELOS et al., 2004).

*C. violaceum* apresenta três grandes *clusters* relacionados com o TTSS, sendo dois contendo genes homólogos à *Salmonella sp* e outro com genes similares a *Yersinia sp*. Na Figura 3 observa-se uma organização esquemática dos genes presentes tanto em *C. violaceum* quanto em *Salmonella sp* (BRITO et al, 2004; VASCONCELOS et al., 2004). A expressão de genes de invasão requer o regulador central HilA, envolvido com a invasão a células epiteliais e a indução de apoptose de macrófagos é absolutamente dependente desta proteína. Já YscD é uma proteína da rota TTSS presente em *Yersinia* e *Pseudomonas* que apresenta um papel na transmissão de sinais para a maquinaria secretória, além de ser essencial para a translocação de proteínas efetoras através da membrana plasmática eucariótica.



**Figura 3** – Organização esquemática dos genes da ilha de patogenicidade 1 da *Salmonella* (SPI1) e genes encontrados na *Chromobacterium violaceum*. Fonte: BRITO et al., 2004.

## 2.5. Métodos de biologia molecular para estudo de diversidade

Com os avanços das técnicas de biologia molecular e o seqüenciamento da *C. violaceum*, foi dado o primeiro passo para a elucidação de todos os aspectos desta espécie: seu metabolismo, potencial biotecnológico, métodos de identificação intra e interespecífica, bem como genes de patogenicidade e interação patógeno-hospedeiro. Para isso, estão disponíveis diversos procedimentos que se tornam importantes ferramentas na identificação de organismos e na análise de polimorfismos (ANTÔNIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, 2004; CRECZYNSKI-PASA; ANTÔNIO, 2004; DUARTE et al., 2004; FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; HUNGRIA et al., 2004; SILVA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2003; ZINGER-YOSOVICH et al., 2006).

Um método de *fingerprint* de DNA baseado em PCR para a análise do genoma como um todo é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Esse método consiste na amplificação aleatória fragmentos de DNA, a partir do DNA genômico, sendo capaz de evidenciar polimorfismos causados por mutações nos sítios de anelamento do *primer* aleatório ou inserções e deleções entre esses sítios (GALLEGO; MARTÍNEZ, 1997; LOPES et al., 2002; MICHEL et al., 1994).

Estudos recentes visando detecção e caracterização de linhagens de bactérias têm obtido bons resultados através da amplificação de genes específicos, incluindo-se os de patogenicidade. A presença ou não de determinado gene tem possibilitado diferenciar a *C. violaceum* de microrganismos relacionados, e a análise de polimorfismos dentro do gene amplificado tem fornecido novos meios de se classificá-las intra-especificamente (HUNGRIA et al., 2005; SCHOLZ et al., 2005a; SCHOLZ et al., 2005b).

Para estudos filogenéticos e de evolução entre bactérias, arqueobactérias e organismos eucariotos, uma ferramenta poderosa consiste na análise de rDNA. É uma análise específica que não produz dados ambíguos e tem alta reprodutibilidade, podendo ser usada tanto entre espécies como para a caracterização de linhagens dentro da mesma espécie (DANCOURT et al., 2000).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das linhagens

A partir da ocorrência de três casos de cromobacteriose entre irmãos no município de Ilhéus, BA após recreação em um lago, foram coletadas amostras de solo e de água do local. As amostras do meio ambiente bem como a de secreção pulmonar foram enviadas para o Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz (LACEN-BA). Deste modo, foram obtidas cinco linhagens provenientes do solo, duas da água, e uma de secreção pulmonar. A linhagem-tipo ATCC (*American Type Culture Collection*) 12472 foi utilizada como controle das reações realizadas neste trabalho (DIAS et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2005).

No presente trabalho, as linhagens obtidas foram identificadas de um a nove, sendo:

- 1 – ATCC 12472 (linhagem-tipo)
- 2 – 32827 (água)
- 3 – 43349 (água)
- 4 – 31620 (secreção pulmonar)
- 5 – 32829 (solo)
- 6 – 32834 (solo)
- 7 – 32840 (solo)
- 8 – 32847 (solo)
- 9 – 32849 (solo)

### 3.2. Estoque

As células de *C. violaceum* foram reativadas em caldo nutriente a 36 °C até obter turvação do caldo. As bactérias foram plaqueadas com o auxílio de um *swab* e encubadas a 36 °C por 48 h. As colônias de cada placa foram raspadas e transferidas para três tubos Eppendorf, contendo caldo nutriente com 20 % de glicerol (400 µL de caldo + 100 µL de glicerol puro). Desse modo, foram realizadas triplicatas de cada linhagem. Os tubos Eppendorf inoculados foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C.

### 3.3. Extração de DNA

As linhagens foram inoculadas em 6 mL de caldo nutriente e incubadas a 36 °C *overnight*. A extração de DNA foi realizada em duplicata. Transferiu-se 1,5 mL da suspensão de células para um tubo Eppendorf, centrifugando a 12.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado. Novamente, foram transferidos 1,5 mL da suspensão de células para o tubo Eppendorf, e este foi submetido à centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. As células foram lavadas com 600 µL de EDTA 0,5 mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0 e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min. Após descartar o sobrenadante, foram acrescentados 360 µL de Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0. Adicionou-se 20 µL de SDS 25 % e homogeneizou-se no *vortex*. As amostras permaneceram em banho-maria a 60 °C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 200 µL de NaCl 5 mol.L<sup>-1</sup> e homogeneizou-se gentilmente. Os tubos foram resfriados em gelo. Centrifugaram-se as amostras a 12.000 rpm por 10 min. Adicionou-se 500 µL de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min. A solução sobrenadante foi transferida para outro tubo e neste foram adicionados 500 µL de clorofórmio. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min. A fase superior foi transferida para outro tubo. Adicionou-se, então, 1 volume de isopropanol e 20 µL de NaCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Precipitou-se o DNA a -80 °C por 20 min e em seguida centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 100 µL de etanol 70 %, centrifugando-se por 2 min. Após desprezar o sobrenadante, o *pellet* permaneceu em temperatura ambiente por 40 min, ou até secar. O DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE com RNase (10 µg/mL) e encubado em banho maria a

37 °C por 30 min. O DNA foi quantificado utilizando como referência marcadores de DNA de 25 ng/μL, 50 ng/μL e de 100 ng/μ por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídeo, (1,25 μL brometo de etídeo para cada 50 mL de gel de agarose) e fotografado em transluminador com luz UV com o auxílio do sistema EDAS Kodak.

### 3.4. Reação RAPD

Nas reações RAPD foram utilizados os *primers* A1 a A20, B1 a B20, C1 a C20. Em cada reação, acrescentou-se 15,1 μL de água miliQ autoclavada, 2,5 μL de tampão 10 x, 1,3 μL de cloreto de magnésio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 1,2 μL de dNTPs 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, 2,5 μL de primer (4 pmol), 1U de Taq DNA polimerase e 2 μL de DNA a 0,5 ng/μL. Para controle negativo, foi realizada uma reação para cada primer, nas mesmas condições, porém sem acrescentar o DNA. Os ciclos utilizados foram: um passo inicial de 94 °C por 4 min e 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 35 °C por 30 s, 72 °C por 60 s. Procedeu-se a eletroforese em gel de agarose 1,2 % preparado com TBE 1 x, e as bandas foram fotografadas em transluminador com luz UV com o auxílio do sistema EDAS Kodak. Para as linhagens que não amplificaram na primeira reação, foi realizada uma segunda reação nas mesmas condições, porém com 3 μL de DNA.

### 3.5. Reação em cadeia da polimerase dos genes *hilA* e *yscD*

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se os *primers forward* e *reverse* para os genes *hilA* e *yscD*, desenhados com base no seqüenciamento do genoma da *C. violaceum*, disponível no site <http://www.brgene.Incc.br/cviolaceum>:

<b>Primer <i>hilA</i>:</b>	<b>TM = 61,0 °C</b>	<b>(763 pb)</b>	
f	5'	GCG AAC TGG TGA GCA AGG A	3'
r	5'	AGA TAG CAT TCG GCC AGG C	3'

**Primer *yscD*: TM = 60,4 °C (587 pb)**

f 5' GTT GGG GCA GGC GAT AGA 3'  
r 5' TAA CCA CAC GCC AGC CAT 3'

As reações e os ciclos foram os mesmos para ambos os *primers*. Em cada reação acrescentou-se 17,0 µL de água miliQ autoclavada, 2,5 µL de tampão 10 x, 1,0 µL de cloreto de magnésio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 2,0 µL de dNTPs 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, 1,0 µL de cada primer a 5 pmol, 1U Taq polimerase e 2 µL de DNA a 0,5 ng/µL. No controle negativo, as condições foram as mesmas, no entanto sem a adição de DNA. Os ciclos utilizados foram: um passo inicial de 94 °C por 4 min, 40 ciclos de 94 °C por 0,5 min, 55 °C por 0,5 min, 72 °C por 1,5 min e de extensão final a 72 °C durante 7 min. Submeteu-se o produto da reação a eletroforese a 80 volts em gel de agarose 1,2 % com TBE corado com brometo de etídeo (1,25 µL brometo de etídeo para cada 50 mL de gel de agarose) e as bandas de DNA amplificado foram fotografadas em transluminador com luz UV com o auxílio do sistema EDAS Kodak.

### 3.6. Seqüenciamento dos produtos de PCR

A partir do produto de PCR dos genes *hilA* e *yscD*, realizou-se a reação de seqüenciamento. Com o objetivo de digerir fita simples, 20 µL de DNA amplificado foram purificados acrescentando 1 µL da enzima Exonuclease I, 1 µL da enzima Shrimp Alkaline Phosphatase e 1 µL de água miliQ autoclavada, permanecendo em seguida a 37 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 min. As reações de seqüenciamento foram realizadas em triplicata, utilizando em cada uma 2 µL da mistura de seqüenciamento, 0,2 µL de *primer* a 5 pmol e 3 µL do DNA, ou seja, o produto da PCR. Realizou-se 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min e 20 s.

Após a reação de seqüenciamento, o DNA foi precipitado. Acrescentou-se em placa 5 µL do produto da reação em cada poço, seguido de um *spin*. Adicionou-se 1 µL de acetato de amônia 1 mol.L<sup>-1</sup> e procedeu-se o *spin*. Foram acrescentados 25 µL de etanol absoluto. A placa foi coberta e rapidamente homogeneizada no *vortex*, permanecendo em repouso no escuro durante 15 minutos. Em seguida o material foi

centrifugado por 45 minutos a 4000 rpm na centrífuga refrigerada, a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 150 µL de etanol 70 %. Novamente a placa foi centrifugada nas mesmas condições durante 15 minutos. Após um *spin* com a placa invertida, foram acrescentados 5 µL de formamida e a placa permaneceu no *vortex* durante 30 minutos. A reação foi aplicada no seqüenciador MEGA BACE 1000.

### 3.7. Análise de restrição do DNA 16S

Os *primers* utilizados para amplificação do rDNA 16S foram fD1 e rD1 que foram desenhados para eubactérias (WEISBURG et al., 1991).

Em cada reação acrescentou-se 15,5 µL de água miliQ autoclavada, 2,5 µL de tampão 10 x, 2,0 µL de cloreto de magnésio 25 mmol.L<sup>-1</sup>, 2,0 µL de dNTPs 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, 1,0 µL de cada *primer* a 5 pmol, 1U de Taq polimerase e 2 µL de DNA a 0,5 ng/µL. Os ciclos utilizados foram: um passo inicial de 94 °C por 4 min, 40 ciclos de 94 °C por 0,5 min, 54 °C por 0,5 min, 72 °C por 1,5 min e de extensão final a 72 °C durante 7 min. Submeteu-se o produto da reação a eletroforese a 90 volts em gel de agarose 1,2 % com TBE corado com brometo de etídeo (1,25 µL brometo de etídeo para cada 50 mL de gel de agarose) e as bandas de DNA amplificado foram fotografadas em transluminador com luz UV com o auxílio do sistema EDAS Kodak.

O material amplificado foi digerido com as seguintes enzimas de restrição: EcoRI, XhoI, BamHI e HindIII. Para cada enzima, procedeu-se a seguinte reação: foram acrescentados 3 µL de tampão 10 x e 0,5 µL de enzima (5 U) em 5 µL do material amplificado (400 ng.µL<sup>-1</sup>) de cada linhagem com 22 µL de água miliQ autoclavada. Os tubos foram incubados *overnight* a 37 °C. Todo o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,0 % preparado com TBE, migrando sob voltagem de 85 volts. Neste gel foi utilizado 3 µL de marcador de peso molecular. A imagem foi obtida pelo sistema EDAS Kodak, em gel corado com brometo de etídeo, visualizado no transluminador com luz UV.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

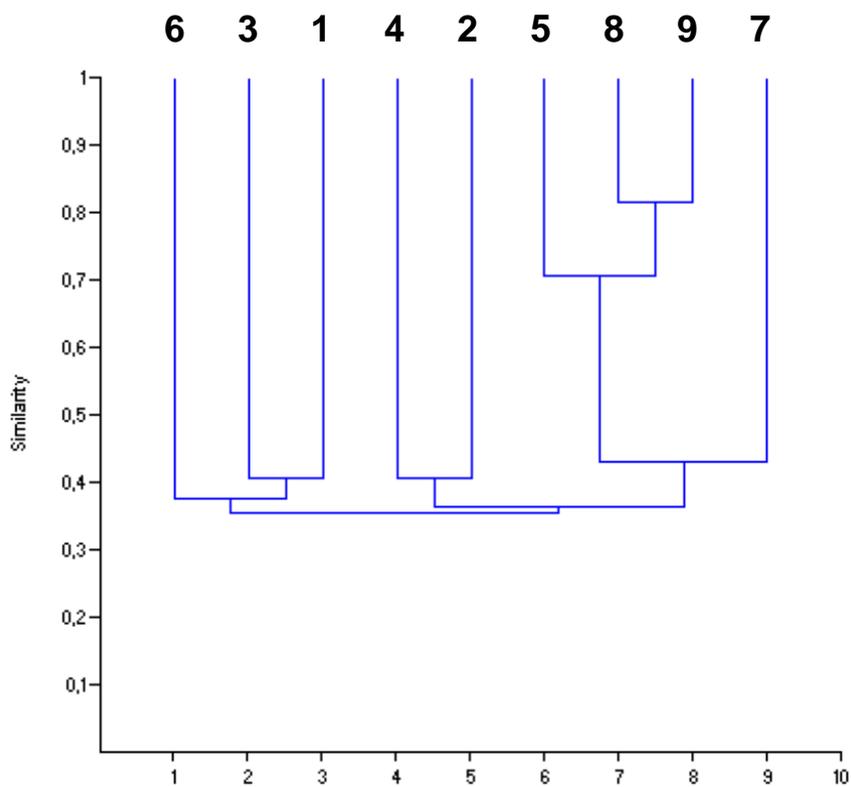
### 4.1. Diversidade genética das linhagens pela técnica de RAPD

A partir do protocolo realizado foi possível obter DNA puro, íntegro e de boa qualidade para a utilização em técnicas de biologia molecular. As reações com 60 *primers* RAPD geraram 134 bandas polimórficas, representando 2,23 bandas por *primer*. As análises com os dados RAPD indicaram ampla diversidade entre as linhagens, como demonstrado na Figura 4. O principal grupo foi formado linhagens 5, 8 e 9, do solo, que apresentaram similaridade variando de 0,70 a 0,81 (Tabela 1). Uma linhagem do solo apresentou similaridade intermediária (0,55 com o isolado 7), enquanto o outro, bem como todos os demais isolados, apresentaram baixa similaridade genética (0,25 a 0,41). A linhagem ATCC 12472, única que não é proveniente de Ilhéus – BA, e sim de águas da Malásia, apresentou similaridade média de 0,37 (0,33 a 0,41) com os demais materiais. Não houve um agrupamento refletindo essas duas regiões. O isolado proveniente da secreção de pulmão apresentou similaridade média de 0,39 (0,34 a 0,41) com os demais materiais. Portanto, os provenientes da água (2 e 3), do paciente (4), da Malásia (1) e o isolado 6 do solo são geneticamente mais diversos entre si do que os demais quatro isolados do solo.

A técnica de RAPD apresentou-se adequada para determinação de sorotipos em patógenos de pleuropneumonia suína (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), quando os métodos normais de identificação não são eficazes. Também seriam úteis para estudos epidemiológicos visando analisar a distribuição de determinada amostra dentro de uma área (COSTA et al., 2004).

**Tabela 1** – Matriz de coeficientes de similaridade genética entre as nove linhagens, com base nos dados de 134 bandas RAPD informativas

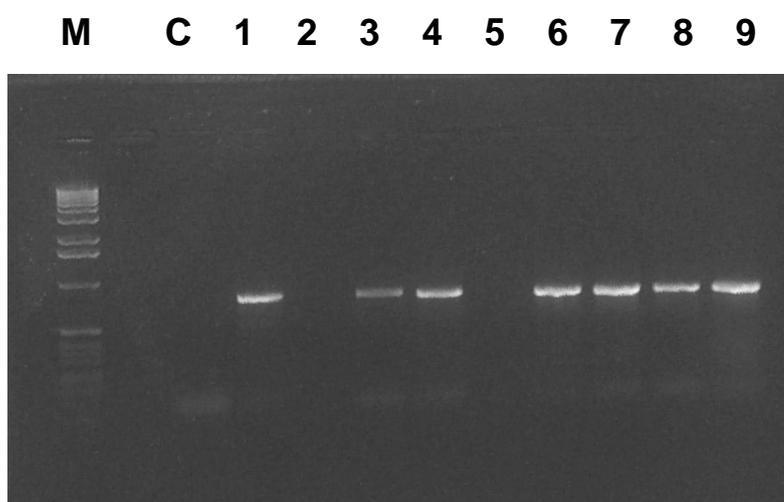
Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1								
2	0,33	1							
3	0,41	0,36	1						
4	0,34	0,41	0,39	1					
5	0,40	0,35	0,31	0,40	1				
6	0,38	0,25	0,38	0,39	0,40	1			
7	0,33	0,33	0,38	0,41	0,38	0,33	1		
8	0,41	0,34	0,36	0,38	0,71	0,33	0,36	1	
9	0,39	0,33	0,32	0,38	0,70	0,36	0,55	0,81	1



**Figura 4** – Dendrograma construído pelo método UPGMA, a partir dos coeficientes de similaridade de Dice com os dados RAPD. **1:** ATCC 12472. **2 e 3:** isolados da água. **4:** isolado de secreção de pulmão. **5 a 9:** isolados do solo.

## 4.2. Reação em cadeia da polimerase dos genes *hilA* e *yscD*

Considerando que os *primers* utilizados para amplificar os genes de patogenicidade foram construídos a partir da linhagem ATCC 12472, a mesma foi utilizada como controle positivo nesta etapa do experimento. Como se pode observar na Figura 5, com exceção das linhagens 2 e 5, todas as outras geraram um produto de aproximadamente 763 pb a partir do *primer hilA*, ou seja, o fragmento obtido foi de tamanho esperado.



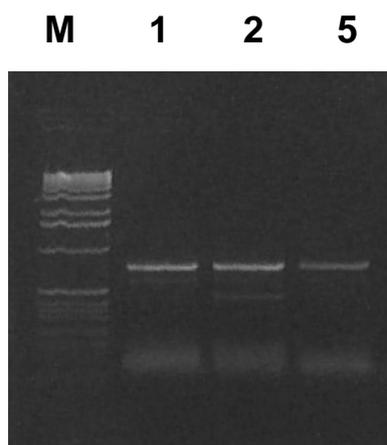
**Figura 5** – Reação PCR do gene *hilA*. **M**: marcador de peso molecular (1KB). **C**: controle negativo. **1**: ATCC 12472. **2 e 3**: isolados da água. **4**: isolado de secreção de pulmão. **5 a 9**: isolados do solo.

As linhagens 2 e 5 foram submetidas a nova reação, porém com mais DNA (alterando de 2  $\mu$ L para 3  $\mu$ L). Nesta segunda reação, essas duas linhagens geraram um produto do tamanho esperado, como demonstrado na Figura 6. Portanto, os resultados obtidos demonstram que todas as linhagens em estudo apresentam o gene *hilA*.

Em um estudo semelhante ao presente trabalho, demonstrou-se que é possível utilizar *recA* como gene alvo de uma PCR para a detecção da *C. violaceum*. Através de enzimas de restrição, foi possível ainda diferenciar os isolados e classificá-los em três genoespécies distintas. Para verificar a possibilidade de falso positivo, foram analisadas ainda diversas espécies de organismos próximos, incluindo *P. aeruginosa* e

*R. solanacearum*, e todos eles apresentaram resultados negativos (SCHOLZ et al., 2005b).

Em outro trabalho, realizado também com genes de patogenicidade, todas as linhagens analisadas amplificaram fragmentos de tamanho esperado na PCR multiplex (SCHOLZ et al., 2005a). Por outro lado, foi detectada a ausência de alguns genes-chave envolvidos com a patogenicidade em isolados provenientes da Amazônia, que estavam presentes na ATCC 12472 (HUNGRIA et al., 2005). Assim, apesar das linhagens de *C. violaceum* amplificarem e os microrganismos relacionados apresentarem resultados negativos, a utilização de genes de patogenicidade para a identificação da espécie deve ser tomada com os devidos critérios. Para a identificação da espécie, o mais seguro seria o estudo de um gene conservado e que não esteja sujeito a transmissão lateral, como é característico das ilhas de patogenicidade.

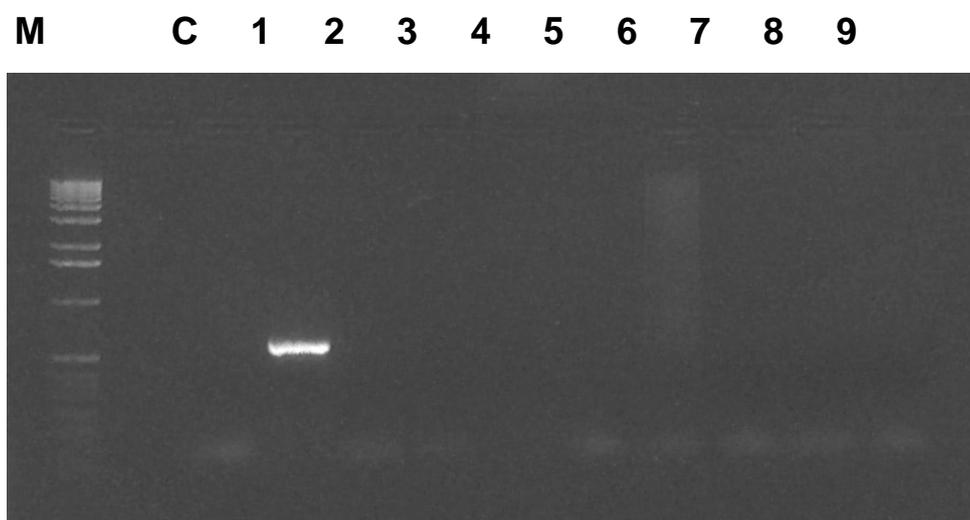


**Figura 6** – Reação PCR do gene *hilA*. **M**: marcador de peso molecular (1KB). **1**: ATCC 12472. **2**: isolado da água. **5**: isolado do solo.

Como demonstrado na Figura 7, para o gene *yscD*, somente a linhagem ATCC 12472, ou seja, o controle positivo da reação, amplificou. O fragmento gerado tem o tamanho aproximado de 587 pb, como era esperado. O resultado negativo na amplificação do gene não necessariamente indica sua ausência nos isolados. Considerando a possível ocorrência de mutação no sítio de anelamento dos *primers*, pode ser que o gene de patogenicidade esteja presente em qualquer uma das linhagens em estudo. Para confirmar com segurança a presença ou ausência do gene

*yscD*, uma reação de *Southern blot* seria adequada. Este experimento permitiria ainda demonstrar o número de cópias, caso o gene esteja presente.

Quanto à presença ou não de genes de patogenicidade em linhagens de *C. violaceum*, já foi demonstrada a ausência de alguns genes de virulência em linhagens da Amazônia, ao passo que outros autores especulam que a capacidade de infecção resultaria de diferentes mecanismos regulatórios de expressão de genes nesta bactéria. Desse modo, há muito a ser elucidado no que se refere às ilhas de patogenicidade e aos mecanismos moleculares de infecção da *C. violaceum* (BRITO et al., 2004; HUNGRIA et al., 2005).

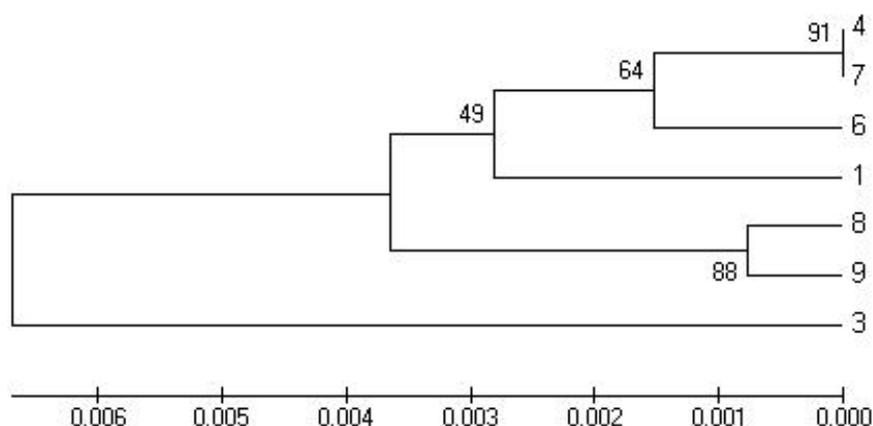


**Figura 7** – Reação PCR do gene *yscD*. **M**: marcador de peso molecular (1KB). **C**: controle negativo. **1**: ATCC 12472. **2 e 3**: isolados da água. **4**: isolado de secreção de pulmão. **5 a 9**: isolados do solo.

#### 4.4. Seqüenciamento dos produtos de PCR do gene *hilA*

A partir dos produtos de PCR gerados pelos *primers hilA*, procedeu-se o seqüenciamento. As linhagens analisadas, com exceção de 2 e 5 (água e solo, respectivamente), geraram seqüências de boa qualidade. Com base no alinhamento das seqüências dos sete isolados, foi evidenciado o agrupamento sem correspondência com a origem geográfica (Figura 8). Dos cinco isolados de solo, dois

formaram um grupo de materiais muito similares, envolvendo os isolados 8, 9 com *bootstrap* de 91 %, um não apresentou dados de seqüência suficiente para análise (5) e dois (6 e 7) formaram um grupo com o isolado de secreção de pulmão (4). Por outro lado, dos dois isolados provenientes de água, um não apresentou dados de seqüência suficiente para análise e o outro se mostrou mais distante de todos os demais materiais, o mesmo acontecendo ao isolado 1.



**Figura 8** – Dendrograma construído pelo método UPGMA, com base nos coeficientes de dissimilaridade de Dice a partir dos dados de seqüenciamento. **1**: ATCC 12472. **3**: isolado da água. **4**: isolado de secreção de pulmão. **6 a 9**: isolados do solo.

Embora os dois agrupamentos evidenciem maior semelhança entre as linhagens 8 e 9, ambas do solo, a análise das seqüências resultou no agrupamento das linhagens 4 (do pulmão), 6 e 7 (do solo), o que não aconteceu com aquela feita a partir dos dados RAPD. Sabe-se que os genes seqüenciados estão inseridos em ilhas de patogenicidade, estando suscetível à transmissão horizontal e diferindo do genoma como um todo. Este fato pode explicar a não congruência entre os dendrogramas gerados a partir das seqüências de DNA e dos marcadores RAPD.

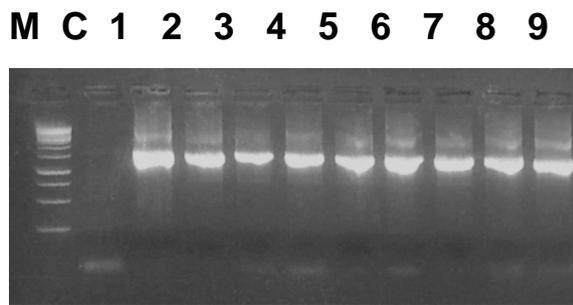
Pode-se observar ainda que, enquanto as similaridades encontradas no genoma como um todo por meio de RAPD ficaram entre 0,25 e 0,81, dentro dos genes todas as similaridades ficaram acima de 0,99. A *C. violaceum* apresenta 12 IS (insertion sequences), contendo ORFs semelhantes a diversas outras espécies de vida-livre, relacionadas particularmente com sua interação com o meio ambiente (ALMEIDA et al.,

2004). Considerando a alta plasticidade deste microrganismo causada principalmente pela transferência lateral de genes, esses resultados de polimorfismo com base no genoma como um todo (RAPD) pode estar refletindo a diversidade típica desta espécie enquanto o baixo polimorfismo do gene expressa uma maior conservação de uma região gênica compartilhada por diferentes grupos taxonômicos. Ou ainda, pode-se estar diante de um gene que tenha sofrido maior intensidade de seleção do que as demais regiões amostradas no genoma.

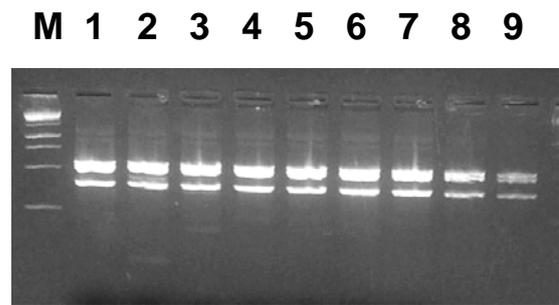
#### **4.4. Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado**

A amplificação utilizando *primers* para sDNA 16S de eubactérias gerou, em todas as linhagens estudadas, uma banda com tamanho aproximado de 1500 pb (Figura 9). Os *primers* fD1 e rD1 foram descritos para utilização em uma ampla diversidade de espécies de bactérias, incluindo bactérias de pigmento roxo (*purple bacteria*) e relacionadas (proteobacteria). Foi utilizado também com sucesso em *Neisseria* e *Pseudomonas*. O fragmento gerado apresentou o tamanho esperado para amplificação com esses *primers*.

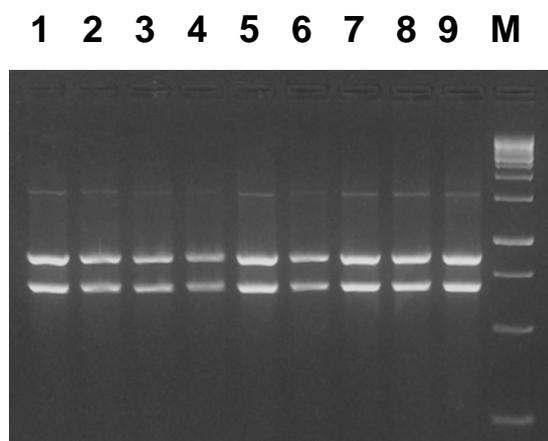
Não houve sítio de restrição no fragmento do gene rDNA 16S para as enzimas HindIII, BamHI e KpnI, ao passo que houve um sítio de restrição para cada uma das enzimas EcoRI, XhoI e HhaI (Figura 10). A análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), com base nas enzimas utilizadas, não revelou polimorfismo entre as amostras. Para as endonucleases EcoRI e HhaI, existe um sítio de clivagem aproximadamente no meio do fragmento amplificado do rDNA 16S. Já para a enzima XhoI, o sítio de restrição localiza-se em uma das extremidades do fragmento amplificado (Figura 10). Os únicos polimorfismos encontrados foram gerados pelas enzimas MspI e AluI, como pode-se observar na Figura 10. Uma banda polimórfica foi encontrada para MspI, enquanto três foram obtidas por meio de digestão com AluI.



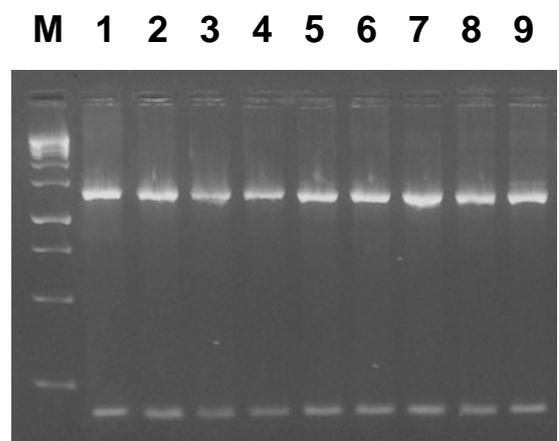
**A**



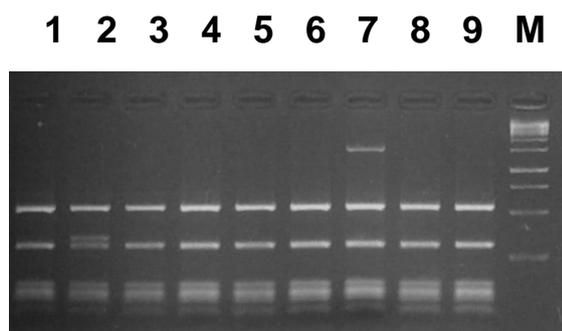
**B**



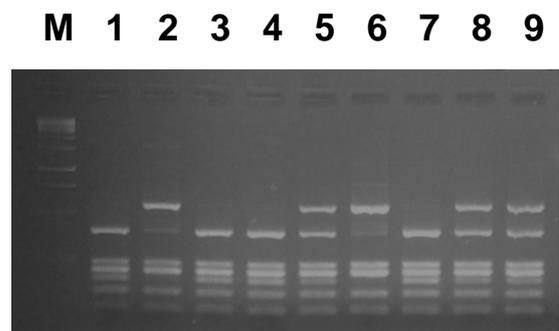
**C**



**D**



**E**



**F**

**Fig 09:** Digestão dos produtos de amplificação do rDNA 16S de diferentes isolados de *Chromobacterium violaceum* (1: ATCC 12472. 2 e 3: isolados da água. 4: isolado de secreção de pulmão. 5 a 9: isolados do solo) com diferentes enzimas de restrição: A – Sem restrição; B – HhaI; C – EcoRI; D – XhoI; E; - MspI; F – AluI. **M:** marcador de peso molecular (1KB).

O número de ensaios de restrição não foi suficiente para evidenciar polimorfismos nesta região. Este resultado está consistente com a natureza altamente conservada dessa região genômica. Tal como esperado, os resultados gerados por RAPDs foram mais variáveis, as regiões de genes de patogenicidade mediamente variáveis e o rDNA, menos variáveis. Para a verificação de diferenças no rDNA 16S de linhagens da mesma espécie, talvez pudesse ser utilizado maior número de enzimas, ou até mesmo o seqüenciamento do fragmento amplificado seria ainda mais específico.

A análise do rDNA 16S tem sido amplamente utilizada para estudos filogenéticos devido à sua alta especificidade e conservação entre os diferentes grupos taxonômicos (AAKRA et al., 1999; DRANCOURT et al., 2000; LIU et al., 1999; WEISBURG et al., 1991). Trabalhos referentes a estudo de diversidade ou de identificação dentro de uma família levaram a resultados satisfatórios por meio de endonucleases de restrição, se revelando um marcador promissor para comparar também a comunidade microbiana de solo (REIS-JUNIOR et al., 2006; SILVA, 2007; URAKAWA et al., 1999) enquanto aqueles com o objetivo de identificar espécies ou de evidenciar diferenças inter e intra-específica, realizam a análise das seqüências (GEE et al., 2003; LEBLOND-BOUGET et al., 1996; TANG et al., 1998).

A partir dos resultados obtidos, torna-se válido tanto dar continuidade com o seqüenciamento dos fragmentos, quanto avaliar outras enzimas de restrição comparando o padrão gerado entre linhagens da *C. violaceum* bem como entre espécies relacionadas. Se for possível encontrar uma bateria de endonucleases capazes de identificar a *C. violaceum*, diferenciá-la de outras espécies ou até mesmo caracterizar suas linhagens, mais um grande passo será dado no sentido de estudos epidemiológicos, de monitoramento ambiental, bem como de diagnóstico. As enzimas têm vantagens sobre o seqüenciamento no que se refere a custos, tempo de execução e facilidade de metodologia.

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi demonstrada ampla diversidade genética entre os nove isolados de *Chromobacterium violaceum*, sendo maior quando avaliada com base em marcadores RAPD do que seqüências do gene de patogenicidade *hilA*. Além disso, os agrupamentos formados com base nesses dois conjuntos de dados não foram congruentes.

Dos dois genes de patogenicidade estudados, o *hilA* foi amplificado em todas as amostras ao passo que *yscD* amplificou apenas na linhagem controle ATCC.

Pela análise de restrição de rDNA 16S amplificado (ARDRA), utilizando-se seis enzimas de restrição, os isolados agruparam-se com menor similaridade.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKRA, A. et al. RFLP of rDNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 123-130, 1999.

ALMEIDA, R. et al. Bacteriophages and insertion sequences of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 76-84, 2004.

ANTÔNIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 85-91, 2004.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. 2003, 136 folhas. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.

BAZYLINSKI, D. A. et al. Denitrification by *Chromobacterium violaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 696-699, 1986.

BRITO, C.F.A. et al. *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 148-161, 2004.

BROWN, K. L. et al. Ecthyma gangrenosum and septic chock syndrome secondary to *Chromobacterium violaceum*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, p. 224-228, 2006.

BRUCKNER. D. A. et al. Nomenclature for aerobic and facultative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 713-723, 1999.

CAREPO, M. S. P. et al. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 181-194, 2004.

CHEN. C. H. et al. *Chromobacterium violaceum* bacteremia: a case report. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 141-144, 2003.

CHENG, A. C.; CURRIE, B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 383-416, 2005.

COLLYN, F. et al. YAPI, a new *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity island. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8, p. 4784-4790, 2004.

CORNELIS, G. R.; GIJSEGEM, F. V. Assembly and function of type III secretory system. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 735-774, 2000.

COSTA, M.M. et al. Aspectos fenotípicos, genotípicos e de diagnóstico da bactéria *A. pleuropneumoniae*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1305-1313, 2004.

COX, N. A. Isolation of a Genus, *Chromobacterium*, not previously found on processed poultry. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 864, 1975.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANTÔNIO, R. V. Energetic metabolism of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 162-166, 2004.

CROSSE, P. A. et al. *Chromobacterium violaceum* infection in two dogs. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 42, p. 154-159, 2006.

DANCOURT, M. et al. 16S ribosomal DNA sequences analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3623-3630, 2000.

DeMOSS, R. D.; HAPPEL, M. E. Nutritional requirements of *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Bacteriology**, v. 77, n. 2, p. 137-141, 1959.

DIAS, J. P. et al. Cromobacteriose em Ilhéus, Bahia: investigação epidemiológica clínica e laboratorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 503-506, 2005.

DUARTE, F. T. et al. DNA repair in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 167-180, 2004.

DURÁN, N. et al. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 38-43, 2001.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F. et al. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, vol. 3, n. 1, p. 134-147, 2004.

FELDMAN, R. B. et al. *Chromobacterium violaceum* infection of the eye. A report of two cases. **Archives of Ophthalmology**, v. 102, n. 5, p. 711-713, 1984.

GALLEGO, F. J.; MARTÍNEZ, I. Method to improve reliability of random amplified polymorphic DNA markers. **BioTechniques**, v. 23, p. 663-664, 1997.

GEE, J. E. et al. Use of 16S rDNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4647-4654.

GILMAN, J. P. Studies on certain species of bacteria assigned to the genus *Chromobacterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 65, n. 1, p. 48-52, 1952.

HUECK, C. J. Type III secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 379-433, 1998.

HUNGRIA, M. et al. Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p.17-23, 2005.

HUNGRIA, M. et al. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 102-116, 2004.

KIM, J. G., et al. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3155-3166, 2003.

KOBURGER, J. A.; MAY, S. O. Isolation of *Chromobacterium* spp. From foods, soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1463-1465, 1982.

LEBLOND-BOURGET, N. et al. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 102-111, 1996.

LEE, J. et al. Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 2068-2070, 1999.

LEIFSON, E. Morphological and physiological characteristics of the genus *Chromobacterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 71, n. 4, p. 393-4000, 1956.

LIU, S. L. et al. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6747-6755, 1999.

LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

MACHER, A. M. et al. Chronic granulomatous disease of childhood and *Chromobacterium violaceum* infections in the southeastern United States. **Annals of Internal Medicine**, v.97, n. 1, p. 51-55, 1982.

MARTIN, J.; BRIMACOMBE, J. *Chromobacterium violaceum* septicaemia: the intensive care management of two cases. **Anaesth Intensive Care**, v. 20, n. 1, p. 88-90, 1992.

MARTINEZ, R. et al. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 111-113, 2000.

MICHEL, M.R. et al. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. **Oxford University Press**, v. 22, n. 10, p. 1921-1922, 1994.

MILLER, D. P. et al. A comparative study of virulent and avirulent strains of *Chromobacterium violaceum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 249-255, 1988.

PETRILLO, V. F. et al. Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South America. **Journal of Infection**, v. 9, n. 2, p. 167-169, 1984.

RAY, P. et al. *Chromobacterium violaceum* septicaemia from north India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 523-526, 2004.

REIS-JUNIOR, F. B. et al. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

RETTORI, D. **Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum***. 1996, 53 folhas. Dissertação (Mestrado em Química), UNICAMP, Campinas, 2000.

SALANOUBAT, M. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v. 415, p. 497-502, 2002.

SCHOLZ, H. C. et al. Detection of *Chromobacterium violaceum* by multiplex PCR targeting the *prig*, *spaO*, *invG* and *sipB* genes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 45-48, 2005 (a).

SCHOLZ, H. C. et al. Genotyping of *Chromobacterium violaceum* isolates by *recA* PCR-RFLP analysis. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 244, p. 347-352, 2005 (b).

SILVA, R. et al. Gene expression in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 64-75, 2004.

SILVA, T. N. **Análise da biodiversidade metagenômica de um solo de Mata Atlântica da Bahia e isolamento de DNA de alto peso molecular visando aplicações biotecnológicas**. 2007, 94 folhas. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

SILVENDRA, R.; TAN, S.H. Pathogenicity of nonpigmented cultures of *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 514-516, 1977.

SIQUEIRA, I.C. et al. *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1443-1445, 2005.

SIRINAVIN, S. et al. Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: case report and review. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, n. 6, p. 559-561, 2005.

SUAREZ, A. E. et al. Nonfatal chromobacterial sepsis. **Southern Medical Journal**, v. 79, n. 9, p. 1146-1148, 1986.

TANG, Y. W. et al. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3674-3679, 1998.

TEOH, A. Y. B. et al. Fatal septicaemia from *Chromobacterium violaceum*: case reports and review of the literature. **Hong Kong Medical Journal**, v. 12, n. 3, p.228-231, 2006.

URAKAWA, H. et al. 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis of psychrotrophic vibrios from Japanese coastal water. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1001-1007, 1999.

VASCONCELOS, A.T.R. et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11660-11665, 2003.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 02, p. 697-703, 1991.

WHITE, N. J. Melioidosis. **The Lancet**, v. 361, p. 1715-1722, 2003.

ZINGER-YOSOVICH, K. Production and properties of the native *Chromobacterium violaceum* fucose-binding lectin (CV-IIL) compared to homologous lectins of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IIL) and *Ralstonia solanacearum* (RA-IIL). *Microbiology*, v. 152, p. 457-463, 2006.

Max Heiman. Webcutter 2.0. <<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>> - Acesso em 08 de maio de 2007.

Virtual Institute of Genomic Research. Brazilian Genome. <<http://www.brgene.Incc.br/cviolaceum>> - Acesso em 08 de maio de 2007.