TRABALHO SOBRE DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE *Chromobacterium violaceum*, UTILIZANDO TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Alexander Birbrair [1];Gustavo Nunes De Oliveira Costa [2];Ronaldo Costa Argôlo Filho [3];Ana Cácia Freire Dos Santos[4];Rachel Passos Rezende [5];João Carlos Teixeira Dias[6];Juliana Magalhães Teixeira [7].

[1]Discente do Curso de Biomedicina, DCB/UESC, Bolsista da FAPESB, alexbirb@usa.com;[2]Discente do Curso de Biomedicina, DCB/UESC;[3]Veterinário, DCAA/UESC, Mestrando, Bolsista de Mestrado da Capes;[4]Biomédica, DCB/UESC, Mestranda, Bolsista de Inovação Tecnológica (itec3) da FAPESB;[5]Doutora em Microbiologia, Professora Adjunta, DCB/UESC, e Bolsista de Prudutividade em Pesquisa do CNPq;[6]Doutor em Microbiologia, DCB/UESC, Professor;[7]Doutora em Microbiologia Agrícola, DCB/UESC, Professora Adjunta.

INTRODUÇÃO

Chromobacterium violaceum é uma bactéria saprofítica encontrada em solo e água de áreas tropicais(Koburger et al, 1982). Trata-se de bastonete gram negativo anaeróbio facultativo, que cresce nos meios usuais formando colônias que normalmente produzem um pigmento violáceo não difusível (Sivedra et al, 1977). Casos esporádicos de infecção em humanos têm sido descritos, principalmente em crianças e indivíduos imuno-comprometidos(Bradley et al, 2000). Em 2004, na cidade de Ilhéus, BA, ocorreram três casos de infecção por C. violaceum. Os pacientes, irmãos com 9, 12 e 14 anos, foram infectados após se banharem em um lago, formado por águas pluviais durante o verão, do lado sul da cidade, entre os quais dois evoluíram a óbito(Siqueira et al, 2005).

. A análise do genoma da linhagem C. violaceum ATCC 12472 possibilitou a detecção de uma variedade de genes com propriedades farmacológicas, biotecnológicas e industriais, além de regiões de patogenicidade e de outros genes de virulência, demonstrando ter esta bactéria um considerado potencial genético para patogenicidade(Vasconcelos et al,2003; Brito et al,2004). Entretanto, ainda são poucas as informações acerca das bases moleculares da virulência do microrganismo e praticamente não existem estudos da diversidade genética entre as linhagens. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética entre os isolados ambientais (solo e água do local onde houve a contaminação dos adolescentes) e o isolado clínico (da secreção do pulmão de um dos pacientes) através da técnica de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante).

DGGE é uma técnica que tem sido empregada em estudos da diversidade molecular e na análise da dinâmica populacional em comunidades bacterianas de diversos ambientes. Geralmente, os padrões gerados são específicos ao indivíduo e, portanto, permite identificar linhagens específicas em determinados ambientes, sem necessidade de prévio cultivo(Coutinho et al, 1999). Desta forma, com a comparação dos padrões genotípicos das linhagens, um marcador molecular poderia ser detectado, de modo que teríamos como identificar especificamente o isolado patogênico e, consequentemente, separá-lo daquelas cepas não patogênicas.

Até agora, todas as linhagens de Chromobacterium violaceum estudadas para a presença de genes relacionados à patogenicidade eram linhagens ambientais. Este foi um dos primeiros trabalhos a utilizar um isolado clínico e o primeiro a empregar a técnica DGGE para estudo de diversidade em Chromobacterium. Neste trabalho empregaram-se os grandes avanços advindos do projeto genoma de C. violaceum na investigação científica de um problema local.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido com nove isolados de C. violaceum: cinco de origem de solo, duas de água da parte sul da cidade de Ilhéus, BA; um clínico, proveniente da secreção do pulmão de um dos pacientes infectados e o outro, a linhagem ATCC 12472 do projeto

genoma. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente a 37ºC por 24 horas.
Após incubação em meio líquido, metade da suspensão de células foi transferida para tubos eppendorfs, os quais foram centrifugados para a coleta das células. Estas foram lavadas em salina-EDTA e ressuspendidas na mesma solução contendo SDS. A purificação do DNA foi por fenol:clorofórmio:álcool-isoamil (25:24:1) ou utilizando um kit (Qiagen cleanup system) de acordo como prescreve o fabricante. A precipitação fez-se com acetato de sódio 3M pH 5,6 e etanol absoluto. O DNA foi guardado para posterior utilização em TE pH8,0 a 4ºC.
Para PCR foi utilizado o DNA extraído. 2µl do DNA foram adicionados à reação de PCR que continha 50µl: 1X de tampão, 3,7mM de MgCl2, 0,4 mM de cada primer, 0,2 mM dNTP, 2,5U Taq DNA Polimerase, (Invitrogen). Os primers utilizados foram para amplificação da região hipervariável V6 do rDNA 16S de eubactérias, sendo que o grampo de GC necessário para análises por DGGE foi adicionado ao primer forward:
F984
(5`-
CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTT
- 3`).
R1378 (5`- CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3`).
As condições para o PCR foram 5 min a 95 C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94 C, 1 min a 55 C e 1 min a 72 C, e uma extensão final a 72 C por 5 min.
Os produtos de amplificação por PCR foram analisados através de um sistema de eletroforese com gradiente de concentração de agente de desnaturação. O gel , com 6% de acrilamida, foi mantido sob temperatura constante de 60 C em tampão TAE 0,5 X (20 mM de tris acetato, 0,5 mM de EDTA, em pH 8). Foi realizado um gradiente inicial de 35 a 70 % da solução desnaturante (100 % do desnaturante foi considerado como sendo 7 M de uréia e 40 % (V/V) de formamida). Os géis foram corridos durante 6 h a 120 V e em seguida os géis foram corados durante 40 minutos no escuro, em 10 mL de solução do tampão TAE 1X (Tris Base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM, em pH 8) contendo 1g/mL de brometo de etídio ou pela coloração Syber Safe.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estabelecidos protocolos para extração de DNA, PCR e DGGE com Chromobacterium violaceum. De acordo com a visualização em gel de agarose, a extração do DNA gerou produtos na ordem de 517pb. Os produtos de PCR obtidos foram de boa qualidade para todos os isolados como demonstrado em gel e portanto perfeitamente aplicáveis ao gel de DGGE. De acordo com os perfis de bandas encontradas em DGGE os isolados analisados não podem ser considerados da mesma linhagem. Baseando-se na amplificação do DNA, foi verificado que os isolados 49S e 47S (isolados de solo) são diferentes dos outros isolados da C. violaceum. Estes achados implicam que a diferença entre estas linhagens pode ser devido a presença ou ausência de algum gene. Os outros isolados (água e solo) são geneticamente idênticos ao isolado clínico.

CONCLUSÕES

O trabalho mostrou que os isolados analisados não são todos da mesma linhagem.
Como recentemente ocorreram casos de infecção por este microrganismo na cidade de Ilhéus, cidade turística, e como ainda não existiam estudos para detectar isolados patogênicos de não patogênicos, este trabalho representou uma aplicação dos esforços anteriores em aprimorar o conhecimento sobre a diversidade genética do gene rDNA 16S pode subsidiar no monitoramento ambiental, bem como auxiliar na pesquisa de marcadores genéticos para o isolado clínico.
Trata-se de bactéria com potencial patogênico. Assim, este estudo auxilia no desenvolvimento de estratégias metodológicas aplicáveis aos estudos de epidemiologia, evitando novos casos de infecção e favorecendo o desenvolvimento de kits diagnósticos. Além de auxiliar no controle de infecções hospitalares, bem como no monitoramento de sítios urbanos com alta frequência humana detectando cepas virulentas em sítios hídricos com grande presença humana.

AGRADECIMENTOS
Thiago Rabelo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADLEY DB e JONHSON LW. Recurrent nonfatal Chromobacterium violaceum infection in a nonimmunocompromised patient. Infections in Medicine 17:686-689, 2000.
BRITO, C.F.A. et al. Chromobacterium violaceum genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. Genetics and Molecular Research, v 3, p.148-161, 2004.
COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological inovations. An. Acad. Bras. Ci., v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.
KOBURGER JA e MAY SO. Isolation of Chromobacterium violaceum spp. from foods, soil and water. Applied and Environmental Microbiology 44:1463-1465, 1982.
SIQUEIRA, I C, DIAS, J, RUF, H, RAMOS, E A G., MACIEL, E A P, ROLIM, A, JABUR, L, VASCONCELOS, L e SILVANY, C. Chromobacterium violaceum in Siblings, Brazil. Emerging Infectious Diseases. V. 11, 1443-1445, 2005.
SIVENDRA R e TAN SH. Pathogenicity of Nonpigmented Cultures of Chromobacterium violaceum. Journal of Clinical Microbiology 5:514-516, 1977.
VASCONCELOS, A.T.R. et al. Complete genome sequence of Chromobacterium violaceum reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 100, p. 11660-11665, 2003.

Apóio Finanaceiro: FAPESB/CNPQ

PALAVRAS-CHAVE: Chromobacterium violaceum;DGGE;PCR

AGÊNCIAS FINANCIADORAS: FAPESB