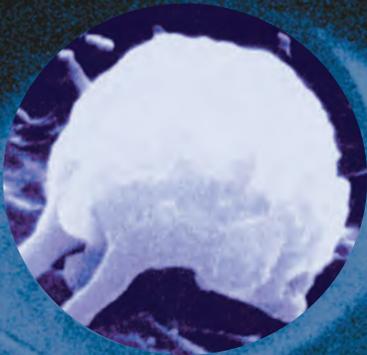


# 10 Classificação dos Micro-organismos

A ciência da classificação, especialmente a classificação dos seres vivos, é chamada de **taxonomia** (do grego para arranjo ordenado). O objetivo da taxonomia é classificar organismos vivos – ou seja, estabelecer relações entre um grupo e outro de micro-organismos e os diferenciar. Devem existir em torno de 100 milhões de organismos vivos diferentes, sendo que menos de 10% foram descobertos, e muito menos, classificados e identificados.

A taxonomia também fornece uma referência comum para identificar organismos já identificados. Por exemplo, quando uma bactéria suspeita de ter causado uma doença específica é isolada de um paciente, as características deste isolado são comparadas com uma lista de características de bactérias previamente classificadas para identificar o isolado (veja o quadro na página 283). Finalmente, a taxonomia é uma ferramenta básica e necessária para os cientistas, fornecendo uma linguagem universal de comunicação.

A taxonomia moderna é um campo excitante e dinâmico. Novas técnicas de biologia molecular e genética estão fornecendo uma nova visão para a classificação e a evolução. Neste capítulo, vamos aprender os diversos sistemas de classificação, os diferentes critérios utilizados na classificação e os testes utilizados para identificar os micro-organismos que já foram classificados.



## SOB O MICROSCÓPIO

*Pneumocystis jirovecii*. Era considerado um protozoário até que uma análise de DNA mostrou que era um fungo. *P. jirovecii* causa pneumonia em pessoas imunocomprometidas.

## P&R

Por que é importante saber se um micro-organismo é classificado como um protozoário ou um fungo?

**Procure pela resposta neste capítulo.**

## O estudo das relações filogenéticas

### OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 10-1** Definir *taxonomia*, *táxon* e *filogenia*.
- 10-2** Discutir as limitações de um sistema de classificação de dois reinos.
- 10-3** Identificar as contribuições de Linnaeus, Von Nägeli, Chatton, Whittaker e Woese.
- 10-4** Discutir as vantagens do sistema de três reinos.
- 10-5** Listar as características dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

Em 2001, um projeto internacional chamado de *All Species Inventory* foi lançado. O propósito do projeto é identificar e registrar todas as espécies de vida na Terra nos próximos 25 anos. Os pesquisadores se encarregaram de uma tarefa desafiadora até o momento, os biólogos identificaram mais de 1,7 milhão de organismos vivos diferentes, mas estima-se que o número de espécies vivas esteja entre 10 e 100 milhões.

Entre esses organismos diferentes existem muitas similaridades. Por exemplo, todos os organismos são constituídos de células envoltas por uma membrana plasmática, utilizam ATP como energia e armazenam sua informação genética no DNA. Essas similaridades são o resultado da evolução a partir de um ancestral comum. Em 1859, o naturalista inglês Charles Darwin propôs que a seleção natural foi responsável pelas similaridades e diferenças entre os organismos. Essas diferenças podem ser atribuídas à sobrevivência dos organismos com características melhor adaptadas a um ambiente em particular.

Para facilitar as pesquisas, o conhecimento e a comunicação, utilizamos a **taxonomia** – ou seja, classificamos os organismos em categorias, ou **taxa** (singular: *táxon*), para mostrar graus de similaridade entre eles. Essas similaridades se devem ao parentesco – todos os organismos são relacionados pela evolução. A **sistemática**, ou **filogenia**, é o estudo da história evolutiva dos organismos. A hierarquia dos taxa reflete relações de evolução ou filogenias.

Desde os tempos de Aristóteles, os organismos vivos eram classificados de duas maneiras, como plantas ou como animais. Em 1735, o botânico sueco Carolus Linnaeus apresentou um sistema formal de classificação dividindo os organismos vivos em dois reinos – *Plantae* e *Animalia*. Ele utilizou nomes em latim para estabelecer uma “linguagem” comum para a sistemática. Contudo, à medida que as ciências biológicas se desenvolveram, os biólogos começaram a procurar por um sistema de classificação *natural* – um sistema que agrupasse os organismos com base nas suas relações ancestrais e permitisse ver a organização da vida. Em 1857, Carl Von Nägeli, um contemporâneo de Pasteur, propôs que as bactérias e os fungos fossem colocados no reino das plantas. Em 1866, Ernest Haeckel propôs o reino *Protista* para incluir bactérias, protozoários, algas e fungos. Devido às discordâncias sobre a definição de protista, durante os 100 anos seguintes, os biólogos continuaram a seguir a classificação de von Nägeli, que colocava as bactérias e os fungos no reino das plantas. É irônico que o sequenciamento recente do DNA tenha posicionado os fungos mais próximos dos

animais do que das plantas. Os fungos foram classificados em seu próprio reino em 1959.

Com o advento da microscopia eletrônica, as diferenças físicas entre as células ficaram evidentes. O termo *procarioto* foi introduzido em 1937 por Edward Chatton para distinguir as células sem núcleo das células nucleadas das plantas e dos animais. Em 1961, Roger Stanier apresentou a definição atual dos procariotos: células nas quais o material nuclear (nucleoplasma) não é envolto por uma membrana nuclear. Em 1968, Robert G. E. Murray propôs o Reino *Prokaryotae*.

Em 1969, Robert H. Whittaker criou o sistema de cinco reinos, no qual os procariotos foram colocados no Reino *Prokaryotae*, ou *Monera*, e os eucariotos constituíram os outros quatro reinos. O Reino *Prokaryotae* foi criado com base em observações microscópicas. Posteriormente, novas técnicas de biologia molecular revelaram que existem na realidade dois tipos de células procarióticas e um tipo de célula eucariótica.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Qual é o valor da taxonomia e da sistemática? **10-1**
- ✓ Por que as bactérias não podem ser colocadas no reino das plantas? **10-2, 10-3**

### Os três domínios

A descoberta de três tipos de células teve como base a observação de que os ribossomos não são os mesmos em todas as células (veja o Capítulo 4, página 95). Os ribossomos fornecem um método de comparação celular, pois estão presentes em todas as células. A comparação das sequências de nucleotídeos no RNA ribossômico (rRNA) (veja a página 292) de diferentes tipos de células mostrou que há três grupos celulares diferentes: os eucariotos e dois tipos diferentes de procariotos – as bactérias e as arqueobactérias.

Em 1978, Carl R. Woese propôs elevar os três tipos de células para um nível acima de reino, chamado de domínio. Woese acreditava que as arqueobactérias e as bactérias, embora similares em aparência, deveriam formar seus próprios domínios separados na árvore evolutiva (**Figura 10.1**). Os organismos são classificados pelo tipo de células nos três domínios. Além das diferenças no rRNA, os três domínios diferem na estrutura lipídica da membrana, nas moléculas de RNA de transferência e na sensibilidade aos antibióticos (**Tabela 10.1**).

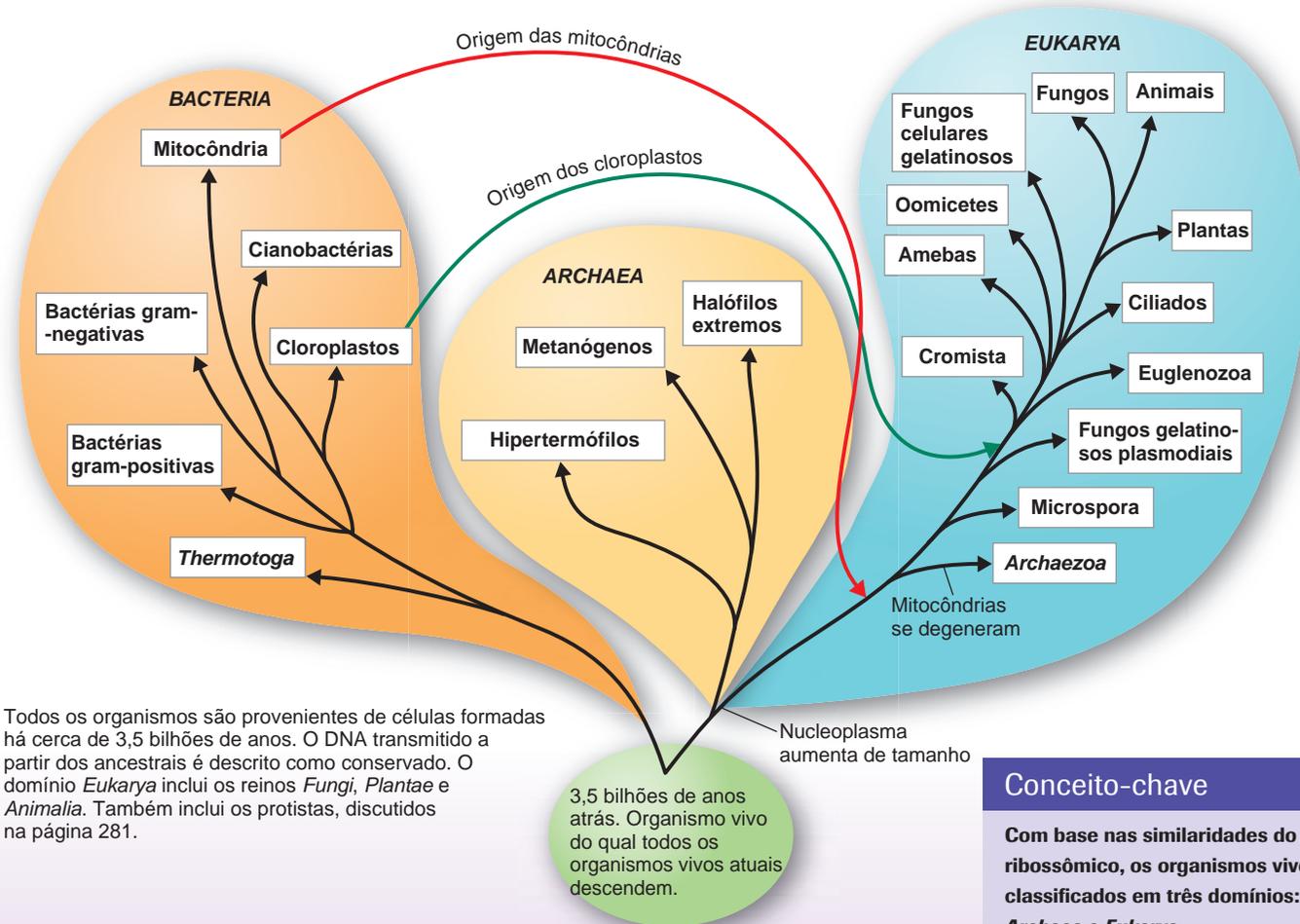
Neste esquema amplamente aceito, animais, plantas, fungos e protistas são reinos do domínio *Eukarya*. O domínio *Bacteria* inclui todos os procariotos patogênicos, assim como muitos dos procariotos não patogênicos encontrados no solo e na água. Os procariotos fotoautotróficos também estão nesse domínio. O domínio *Archaea* inclui procariotos que não têm peptidoglicana nas suas paredes celulares e que frequentemente vivem em ambientes extremos e realizam processos metabólicos incomuns. *Archaea* inclui três grupos principais:

1. Os metanógenos, anaeróbicos restritos que produzem metano (CH<sub>4</sub>) a partir de dióxido de carbono e hidrogênio.

Figura 10.1

## FIGURA FUNDAMENTAL Sistema de três domínios

Esta figura mostra as relações entre os organismos vivos. As linhas mostram como cada grupo descende dos seus ancestrais. Os fundamentos da classificação e da taxonomia são necessários para entender a suscetibilidade dos diferentes micro-organismos a vários métodos de controle, como discutido nos Capítulos 7 e 20.



Todos os organismos são provenientes de células formadas há cerca de 3,5 bilhões de anos. O DNA transmitido a partir dos ancestrais é descrito como conservado. O domínio *Eukarya* inclui os reinos *Fungi*, *Plantae* e *Animalia*. Também inclui os protistas, discutidos na página 281.

Nucleoplasma aumenta de tamanho

3,5 bilhões de anos atrás. Organismo vivo do qual todos os organismos vivos atuais descendem.

### Conceito-chave

Com base nas similaridades do RNA ribossômico, os organismos vivos são classificados em três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

2. Os halófilos extremos, que requerem altas concentrações de sais para sobreviver.
3. Os hipertermófilos, que normalmente crescem em ambientes quentes.

A relação evolutiva entre os três domínios é assunto da pesquisa atual dos biólogos. Originalmente, achava-se que as arqueobactérias eram o grupo mais primitivo, enquanto as bactérias foram tidas como mais relacionadas aos eucariotos. Contudo, estudos de rRNA indicam que o ancestral universal dividiu-se em três linhagens. Essa divisão levou a *Archaea*, *Bacteria* e ao que

finalmente tornou-se o nucleoplasma dos eucariotos. Os fósseis mais antigos conhecidos são os restos de procariotos que viveram há mais de 3,5 bilhões de anos. As células eucarióticas evoluíram mais recentemente, em torno de 1,4 bilhão de anos. De acordo com a teoria endossimbiótica, as células eucarióticas evoluíram a partir de células procarióticas vivendo uma dentro da outra, como endossimbiontes (veja o Capítulo 4, página 106). Na verdade, as similaridades entre as células procarióticas e as organelas eucarióticas fornecem evidências fortes a favor dessa relação endossimbiótica (Tabela 10.2).

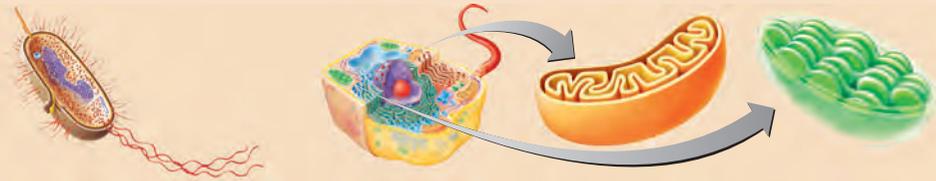
Tabela 10.1 Algumas características de *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*

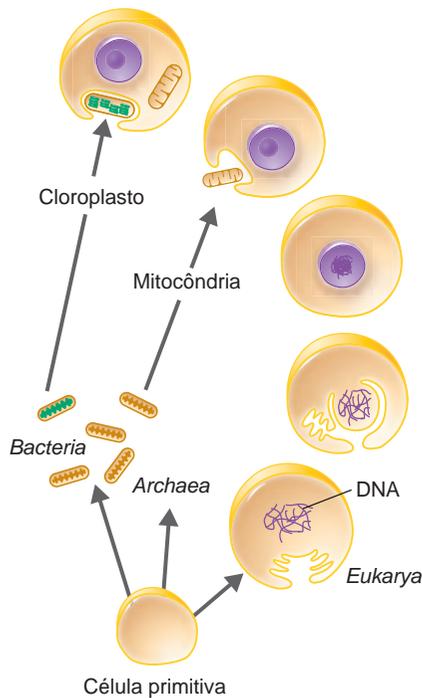
	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Eukarya</i>
	 <i>Sulfolobus</i> MEV 0,5 μm	 <i>E. coli</i> MEV 1 μm	 <i>Amoeba</i> MEV 10 μm
<b>Tipo de célula</b>	Procariótica	Procariótica	Eucariótica
<b>Parede celular</b>	Varia na composição; não contém peptidoglicana	Contém peptidoglicana	Varia na composição; contém carboidratos
<b>Lípídeos de membrana</b>	Compostos de cadeias de carbono ramificadas ligadas ao glicerol por ligação éter	Compostos de cadeias de carbono lineares ligadas ao glicerol por ligação éster	Compostos de cadeias de carbono lineares ligadas ao glicerol por ligação éster
<b>Primeiro aminoácido na síntese de proteínas</b>	Metionina	Formilmetionina	Metionina
<b>Sensibilidade a antibióticos</b>	Não	Sim	Não
<b>Alça do rRNA*</b>	Ausente	Presente	Ausente
<b>Braço comum do tRNA**</b>	Ausente	Presente	Presente

\* Liga-se à proteína ribossomal; encontrada em todas as bactérias.  
\*\* Uma sequência de bases no tRNA encontrada em todos os eucariotos e bactérias: guanina-timina-pseudouridina-citosina-guanina.

Tabela 10.2 Comparação de células procarióticas e eucarióticas

	<b>Célula procariótica</b>	<b>Célula eucariótica</b>	<b>Organelas eucarióticas (mitocôndrias e cloroplastos)</b>
<b>DNA</b>	Um circular; algumas vezes dois circulares; alguns lineares	Linear	Circular
<b>Histonas</b>	Em arqueobactérias	Sim	Não
<b>Primeiro aminoácido na síntese de proteína</b>	Formilmetionina (bactéria) Metionina (arqueobactéria)	Metionina	Formilmetionina
<b>Ribossomos</b>	70S	80S	70S
<b>Crescimento</b>	Fissão binária	Mitose	Fissão binária





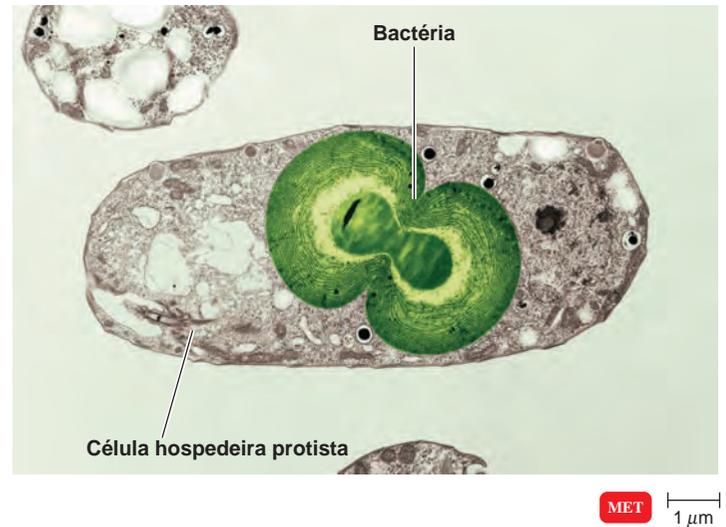
**Figura 10.2 Um modelo da origem dos eucariotos.** Uma invaginação da membrana plasmática pode ter formado o envelope nuclear e o retículo endoplasmático. Similaridades, incluindo as sequências de rRNA, indicam que procariotos endossimbióticos originaram as mitocôndrias e os cloroplastos.

**P** Quantas membranas compõem o envelope nuclear de uma célula eucariótica?

A célula nucleoplásmica original era procariótica. Contudo, dobraduras em sua membrana plasmática podem ter envolvido a região nuclear para produzir o verdadeiro núcleo (Figura 10.2). Recentemente, pesquisadores franceses deram suporte a esta hipótese com suas observações de um verdadeiro núcleo na bactéria *Gemmata* (veja a Figura 11.23). Ao longo do tempo, o cromossomo do nucleoplasma pode ter adquirido peças como os transposons (página 237). Em algumas células, este grande cromossomo pode ter se fragmentado em cromossomos lineares menores. Talvez células com cromossomos lineares tivessem uma vantagem na divisão celular em relação àquelas com um cromossomo circular grande de difícil manutenção.

Essa célula nucleoplásmica forneceu o hospedeiro original no qual bactérias endossimbióticas desenvolveram-se em organelas (veja a página 106). Um exemplo de procariotos atuais vivendo dentro de uma célula eucariótica é mostrado na Figura 10.3. A célula tipo cianobactéria e o hospedeiro eucariótico necessitam um do outro para sobreviverem.

No sequenciamento do genoma de um procarioto chamado de *Thermotoga maritima*, a microbiologista Karen Nelson descobriu que essa espécie tem genes similares aos membros tanto do domínio *Bacteria* como do domínio *Archaea*. Seu achado sugere que *Thermotoga* seja uma das primeiras células. Por essa razão, *Thermotoga* é referido como um “gênero de ramificação muito antiga”, ou seja, ele está próximo da origem ou “raiz” da árvore evolutiva.



**Figura 10.3 *Cyanophora paradoxa*.** Este organismo, no qual o hospedeiro eucariótico e a bactéria necessitam um do outro para sobrevivência, fornece um exemplo atual de como as células eucarióticas podem ter evoluído.

**P** Quais aspectos os cloroplastos, as mitocôndrias e as bactérias têm em comum?

A taxonomia fornece ferramentas para esclarecer a evolução dos organismos, assim como suas relações. Novos organismos estão sendo descobertos a cada dia, e os taxonomistas continuam procurando um sistema natural de classificação que reflita as relações filogenéticas.

## A hierarquia filogenética

Na hierarquia filogenética, reagrupar os organismos de acordo com as propriedades comuns implica que um grupo de organismos evoluiu a partir de um ancestral comum; cada espécie mantém algumas das características do ancestral. Uma parte da informação utilizada para classificar e determinar as relações filogenéticas em organismos superiores vem dos fósseis. Ossos, conchas ou caules que contenham material mineral ou tenham deixado impressões na rocha que antes era lama são exemplos de fósseis.

As estruturas da maioria dos micro-organismos não são facilmente fossilizadas. Algumas exceções são as seguintes:

- Um protista marinho cujas colônias fossilizadas formam as White Cliffs em Dover, na Inglaterra.
- Os estromatólitos, os restos fossilizados de bactérias filamentosas e sedimentos que apareceram entre 0,5 e 2 bilhões de anos atrás (Figura 10.4a e Figura 10.4b).
- Fósseis semelhantes a cianobactérias encontrados em rochas na Austrália ocidental que possuem de 3,0 a 3,5 bilhões de anos. Acredita-se que sejam os mais velhos fósseis conhecidos. Alguns fósseis de procariotos são mostrados na Figura 10.4c.

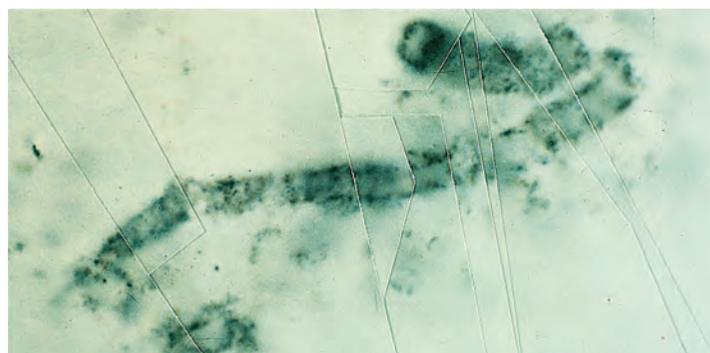
Uma vez que não existem evidências de fósseis da maioria dos procariotos, sua filogenia deve estar baseada em outras evidências. Em uma exceção notável, os cientistas podem ter isolado bactérias



(a) 30 cm



(b) 2 cm



(c) MET 15 μm

**Figura 10.4 Procariotos fossilizados** (a) Comunidades bacterianas formam pilares rochosos chamados de estromatólitos, que começaram a crescer há 3.000 anos. (b) Corte transversal de um estromatólito fossilizado que cresceu há dois bilhões de anos. (c) Procariotos filamentosos do início do período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos) da Austrália ocidental.

**P** Que evidência é usada para determinar a filogenia de procariotos?

e leveduras vivas de 25 a 40 milhões de anos. Em 1995, o microbiologista americano Raul Cano e seus colegas relataram o crescimento de *Bacillus sphaericus* e de outros micro-organismos ainda não identificados que teriam sobrevivido em âmbar (resina de planta fossilizada) durante milhões de anos. Se for confirmado, essa des-

coberta deverá fornecer mais informações sobre a evolução dos micro-organismos.

Conclusões obtidas do sequenciamento de rRNA e de estudos de hibridização de DNA (discutidos na página 291) de ordens e famílias selecionadas de eucariotos estão de acordo com os registros de fósseis. Isso tem encorajado os pesquisadores a utilizar a hibridização de DNA e o sequenciamento de rRNA para compreender as relações evolutivas entre os grupos de procariotos.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Qual evidência sustenta a classificação dos organismos em três domínios? **10-4**
- ✓ Compare *Archaea* e *Bacteria*, *Bacteria* e *Eukarya*, e *Archaea* e *Eukarya*. **10-5**

## Classificação dos organismos

### OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 10-6** Explicar por que nomes científicos são utilizados.
- 10-7** Listar os taxa mais importantes.
- 10-8** Diferenciar *cultura*, *clone* e *linhagem*.
- 10-9** Listar as principais características utilizadas para diferenciar os três Reinos de *Eukarya* multicelular.
- 10-10** Definir *protista*.
- 10-11** Diferenciar espécies eucarióticas, procarióticas e virais.

Os organismos vivos são agrupados de acordo com as características similares (classificação), e a cada organismo é atribuído um nome científico. As normas para classificação e denominação, utilizadas no mundo todo pelos biólogos, são discutidas a seguir.

### Nomenclatura científica

Em um mundo habitado por milhões de organismos vivos, os biólogos devem ter certeza que conhecem exatamente o micro-organismo sobre o qual estão discutindo. Não podemos utilizar nomes comuns, porque muitas vezes o mesmo nome é utilizado para muitos organismos diferentes em locais diferentes. Por exemplo, existem dois organismos diferentes com o mesmo nome: musgo espanhol, sendo que nenhum deles é realmente um musgo. Além disso, idiomas locais são utilizados para nomes comuns. Como os nomes comuns podem induzir ao erro e estão em idiomas diferentes, um sistema de nomes científicos, denominado *nomenclatura científica*, foi desenvolvido no século XVIII.

Relembre do Capítulo 1 (página 2) que cada organismo recebe dois nomes, ou um binômio. Esses são o nome do **gênero** e o nome do **epíteto específico (espécie)**, sendo que ambos são escritos sublinhados ou em itálico. O nome do gênero começa sempre com letra maiúscula e é sempre um substantivo. O nome da espécie começa com letra minúscula e geralmente é um adjetivo. Como esse sistema fornece dois nomes para cada organismo, ele é chamado de **nomenclatura binomial**.

Vamos considerar alguns exemplos. O nosso gênero e o nosso epíteto específico são *Homo sapiens*. O substantivo, ou gêne-

ro, significa homem; o adjetivo, ou epíteto específico, significa sábio. Um fungo que contamina o pão é chamado de *Rhizopus stonolifer*. *Rhizo* descreve a estrutura semelhante a raiz do fungo; *stolo* descreve as hifas longas. A Tabela 1.1 na página 4 contém mais exemplos.

Os binômios são utilizados por cientistas do mundo todo, independente de sua língua nativa, permitindo que eles compartilhem seu conhecimento de maneira eficiente e exata. Várias entidades científicas são responsáveis por estabelecer normas que governam a denominação dos organismos. As normas para a denominação de protozoários e vermes parasitas estão publicadas no *International Code of Zoological Nomenclature*. As normas para a denominação de fungos e algas estão publicadas no *International Code of Botanical Nomenclature*. As normas para a denominação de novos procariotos classificados e a atribuição de um táxon são estabelecidas pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos e estão publicadas no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, antes de serem incorporadas em um livro de referência chamado de *Bergey's Manual*. De acordo com o *Bacteriological Code*, os nomes científicos devem ser derivados do latim (um nome de gênero também pode ser derivado do grego) ou latinizados pela adição de um sufixo apropriado. Os sufixos para ordem e família são *-ales* e *-aceae*, respectivamente.

À medida que novas técnicas de laboratório possibilitam uma caracterização mais detalhada dos micro-organismos, dois gêneros podem ser reclassificados em um único gênero, ou um gênero pode ser dividido em dois ou mais gêneros. Por exemplo, os gêneros *Diplococcus* e *Streptococcus* foram combinados em 1974; a única espécie de diplococo é agora chamada de *Streptococcus pneumoniae*. Em 1984, estudos de hibridização de DNA indicaram que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* tinham um parentesco distante com as outras espécies de estreptococos; como consequência, um novo gênero chamado de *Enterococcus* foi criado e essas espécies foram renomeadas *E. faecalis* e *E. faecium*.

Em 2001, com base em estudos de hibridização DNA-DNA e de rRNA, algumas espécies de *Chlamydia* foram mudadas para um novo gênero, *Chlamydophila* (veja a página 292). Realizar uma transição para um novo nome pode gerar confusão, e por isso um nome antigo muitas vezes é escrito entre parênteses. Por exemplo, um médico procurando por uma informação sobre a causa dos sintomas parecidos com pneumonia (meliodose) em um paciente, poderá encontrar o nome da bactéria *Burkholderia* (*Pseudomonas pseudomallei*).

Obter o nome de um micro-organismo é importante para determinar qual tratamento usar; drogas antifúngicas não funcionarão contra bactérias, e drogas antibacterianas não funcionarão contra vírus.

## A hierarquia taxonômica

Todos os organismos podem ser agrupados em uma série de subdivisões que formam uma hierarquia taxonômica. Linnaeus desenvolveu essa hierarquia para sua classificação das plantas e dos animais. Uma **espécie eucariótica** é um grupo de organismos intimamente relacionados que se reproduzem entre si. (Espécies bacterianas serão discutidas em breve.) Um gênero consiste em espécies

que diferem entre si em certas características, mas são relacionadas pela descendência. Por exemplo, *Quercus*, o gênero do carvalho, consiste em todos os tipos de carvalho (carvalho branco, carvalho vermelho, carvalho veludo, e outros). Mesmo sabendo que cada espécie de carvalho difere das outras, elas são relacionadas geneticamente. Como um grupo de espécies forma um gênero, gêneros relacionados formam uma **família**. Um grupo de famílias similares forma uma **ordem**, e um grupo de ordens similares forma uma **classe**. Por sua vez, classes relacionadas formam um **filo**. Portanto, um organismo específico (ou espécie) tem um nome de gênero e um epíteto específico e pertence a uma família, uma ordem, uma classe e um filo.

Todos os filios ou divisões relacionadas entre si formam um **reino**, e os reinos relacionados são reagrupados em um **domínio** (Figura 10.5).

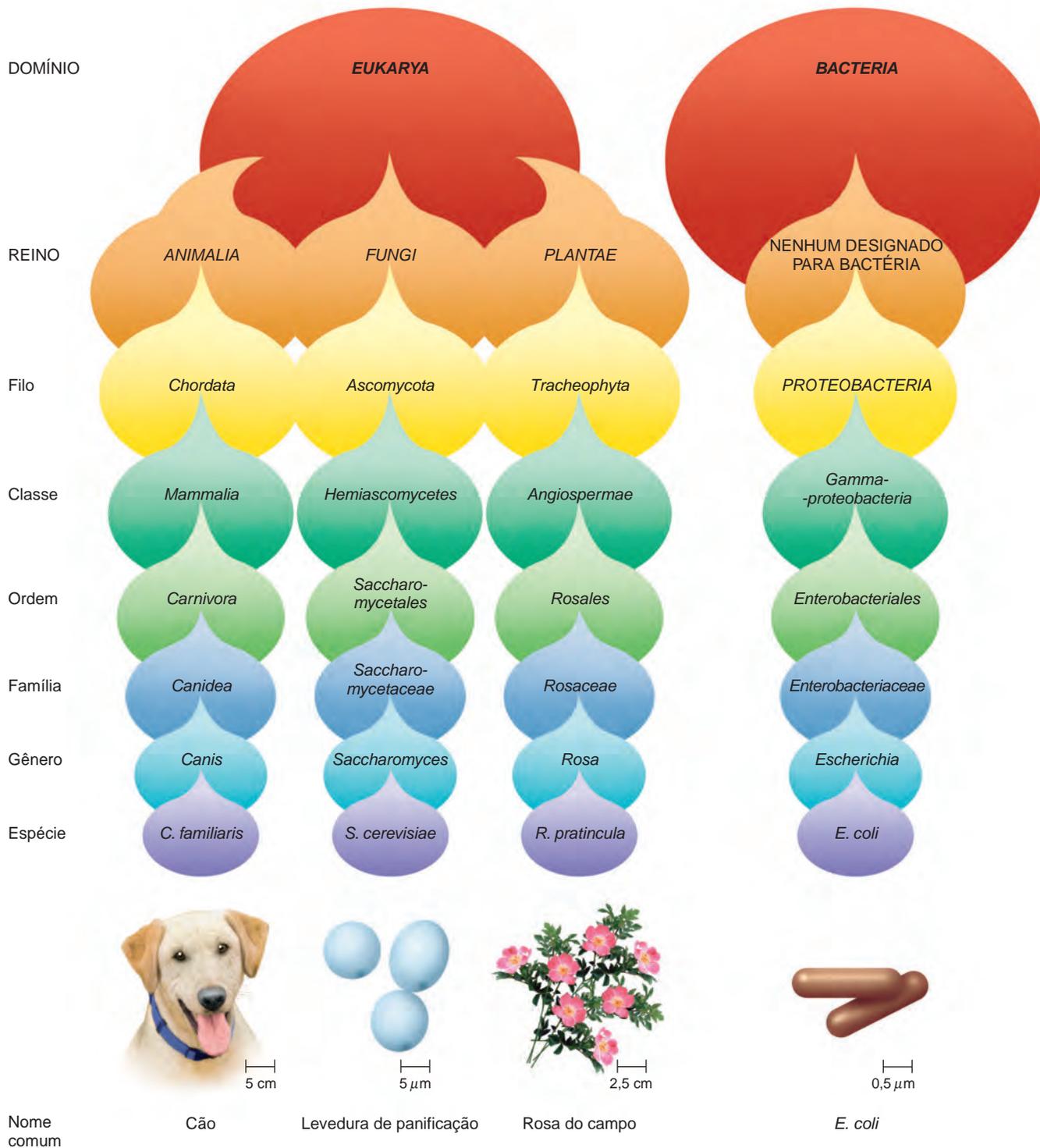
## TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Utilizando *Escherichia coli* e *Entamoeba coli* como exemplos, explique por que o nome do gênero deve sempre ser escrito por extenso na primeira citação. Por que o uso da nomenclatura binomial é preferível ao uso de nomes comuns? **10-6**
- ✓ Procure a bactéria gram-positiva *Staphylococcus* no Apêndice F. A qual bactéria esse gênero é mais relacionado: *Gemella* ou *Streptococcus*? **10-7**

## Classificação dos procariotos

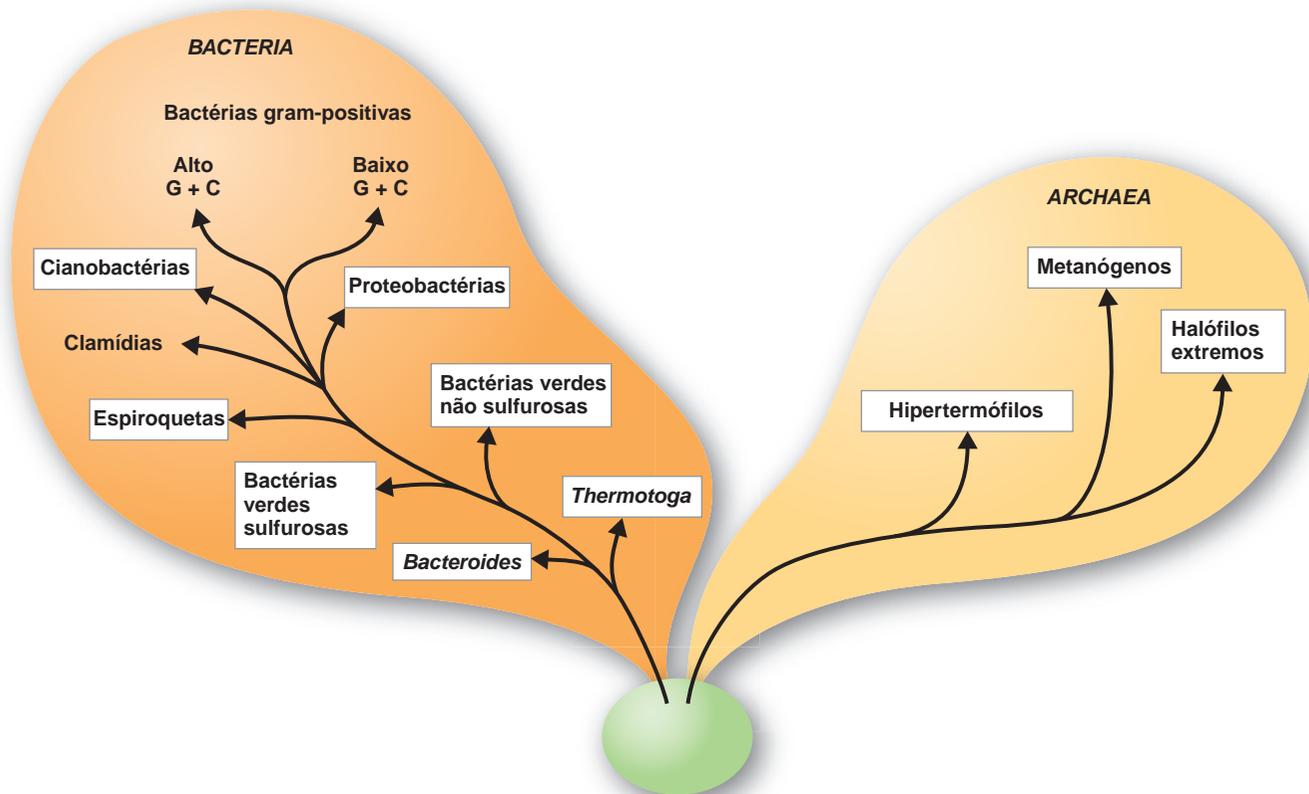
O esquema de classificação taxonômica dos procariotos é encontrado no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, segunda edição (veja o Apêndice F). Os primeiros dois volumes foram publicados, com os três volumes restantes previstos para os próximos anos. No *Bergey's Manual*, os procariotos são divididos em dois domínios: *Bacteria* e *Archaea*. Cada domínio é dividido em filios. Lembre que a classificação se baseia nas similaridades das sequências de nucleotídeos no rRNA. As classes são divididas em ordens; as ordens, em famílias; as famílias, em gêneros; e os gêneros, em espécies.

Uma espécie procariótica é definida de maneira diferente das espécies eucarióticas, que são um grupo de organismos intimamente relacionados que podem se reproduzir entre si. Diferente da reprodução dos organismos eucarióticos, a divisão celular das bactérias não é diretamente ligada à conjugação sexual, que não é frequente e não precisa ser sempre espécie-específica. Uma **espécie procariótica**, entretanto, é definida simplesmente como uma população de células com características similares. (Os tipos de características serão discutidos mais tarde neste capítulo.) Os membros de uma espécie bacteriana são essencialmente similares entre si, mas são distintos dos membros de outras espécies, em geral com base em várias características. Como você sabe, as bactérias que crescem em um tempo determinado em um meio são chamadas de cultura. Uma cultura pura frequentemente é um **clone**, ou seja, uma população de células derivada de uma única célula parental. Todas as células no clone devem ser idênticas. Contudo, em alguns casos, as culturas puras da mesma espécie não são idênticas em todas as características. Cada um desses grupos é denominado **linhagem**. As linhagens são identificadas por números, letras ou nomes que seguem o epíteto específico.



**Figura 10.5 A hierarquia taxonômica.** Os organismos são reagrupados de acordo com a proximidade de sua relação. Espécies que são intimamente relacionadas são reagrupadas no mesmo gênero. Por exemplo, a levedura de panificação pertence ao gênero que inclui também a levedura da massa azeda (*Saccharomyces exiguus*). Gêneros relacionados como *Saccharomyces* e *Candida* são colocados em uma família, e assim por diante. Cada grupo superior é mais abrangente. O domínio *Eukarya* inclui todos os organismos com células eucarióticas.

**P** Qual é a definição biológica de família?



**Figura 10.6** Relações filogenéticas dos procariotos. As setas indicam as linhas principais de descendência dos grupos bacterianos. Filos selecionados são indicados pelos quadros brancos.

**P** **Membros de qual filo podem ser identificados pela coloração de Gram?**

O *Bergey's Manual* fornece uma referência para identificação de bactérias em laboratório, assim como um esquema de classificação para bactérias. Um esquema de relações evolutivas de bactérias é mostrado na **Figura 10.6**. As características utilizadas para classificar e identificar as bactérias são discutidas no Capítulo 11.

### Classificação dos eucariotos

Alguns reinos no Domínio *Eukarya* são mostrados na Figura 10.1. Desde 1969, os organismos eucarióticos simples, a maioria unicelular, têm sido agrupados no Reino **Protista**, um reino que abriga uma variedade de organismos. Historicamente, os organismos eucarióticos que não se encaixavam em outros reinos eram colocados no *Protista*. Aproximadamente 200.000 espécies de protistas foram identificadas até agora, e esses organismos são bastante diversos do ponto de vista nutricional – desde fotossintético até parasita intracelular obrigatório. O sequenciamento do rRNA está tornando possível a divisão dos protistas em grupos com base em sua descendência a partir de ancestrais comuns. Consequentemente, uma vez classificados, os organismos são divididos em **clades**, ou seja,

grupos relacionados geneticamente. Por conveniência, continuaremos a utilizar o termo protista para indicar eucariotos unicelulares e seus parentes próximos. Esses organismos serão discutidos no Capítulo 12.

Fungos, plantas e animais formam os três reinos de organismos eucarióticos mais complexos, sendo a maioria multicelular.

O Reino *Fungi* inclui as leveduras unicelulares, os bolores multicelulares e espécies macroscópicas como os cogumelos. Para obter matéria-prima para as funções vitais, um fungo absorve a matéria orgânica dissolvida através de sua membrana plasmática. As células de um fungo multicelular normalmente são unidas para formar tubos finos chamados de *hifas*. As hifas são divididas em unidades multinucleadas separadas por paredes transversais que possuem poros, de forma que o citoplasma possa fluir entre essas unidades similares a células. Os fungos se desenvolvem a partir de esporos ou de fragmentos de hifas (veja a Figura 12.1, página 331).

O Reino *Plantae* (plantas) inclui algumas algas e todos os musgos, samambaias, coníferas e plantas com flores. Todos os membros desse reino são multicelulares. Para obter energia, uma planta utili-

za a fotossíntese, o processo que converte o dióxido de carbono e a água em moléculas orgânicas utilizadas pela célula.

O reino dos organismos chamado de *Animalia* (animais) inclui esponjas, vários vermes, insetos e animais com esqueleto (vertebrados). Os animais obtêm nutrientes e energia pela ingestão de matéria orgânica por meio de algum tipo de boca.

## Classificação dos vírus

Os vírus não são classificados como parte de nenhum dos três domínios. Eles não são compostos por células, e utilizam a maquinaria anabólica dentro da célula hospedeira para se multiplicar. O genoma viral pode direcionar a biossíntese no interior da célula hospedeira, e alguns genomas podem se incorporar ao genoma do hospedeiro. O nicho ecológico de um vírus é sua célula hospedeira específica, logo o vírus pode estar mais intimamente relacionado com seu hospedeiro do que com outros vírus. O *International Committee on Taxonomy of Virus* (Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus) define uma **espécie viral** como uma população de vírus com características similares (incluindo morfologia, genes e enzimas) que ocupam um nicho ecológico específico.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, eles devem ter se desenvolvido assim que uma célula hospedeira adequada se desenvolveu. Existem duas hipóteses que tentam explicar a origem dos vírus: (1) eles surgiram de fitas de ácidos nucleicos de replicação independente (como os plasmídeos) e (2) eles se desenvolveram a partir de células degenerativas que, após muitas gerações, teriam perdido gradualmente sua capacidade de sobreviver de forma independente, mas que poderiam viver quando associadas a outras células. Os vírus serão discutidos no Capítulo 13.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Utilize os termos espécie, cultura, clone e linhagem em uma sentença para descrever o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. **10-8**
- ✓ Suponha que você descobriu um novo organismo; ele é multicelular, nucleado, heterotrófico e tem parede celular. A qual reino ele pertence? **10-9**
- ✓ Escreva sua própria definição de protista. **10-10**
- ✓ Por que a definição de uma espécie viral não serviria para uma espécie bacteriana? **10-11**

## Métodos para classificação e identificação de micro-organismos

### OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 10-12** Comparar e diferenciar classificações e identificações.
- 10-13** Explicar o propósito do *Bergey's Manual*.
- 10-14** Descrever como colorações e testes bioquímicos são utilizados para identificar bactérias.
- 10-15** Diferenciar *Western blotting* e *Southern blotting*.

**10-16** Explicar como os testes sorológicos e a tipagem com fagos podem ser utilizados para identificar uma bactéria desconhecida.

**10-17** Descrever como um micro-organismo recentemente descoberto pode ser classificado por composição de bases do DNA, *DNA fingerprinting* e PCR.

**10-18** Descrever como os micro-organismos podem ser identificados por hibridização de ácidos nucleicos, *Southern blotting*, chips de DNA, ribotipagem e FISH.

**10-19** Diferenciar chave dicotômica e cladograma.

Um esquema de classificação fornece uma lista de características e meios de comparação para ajudar na identificação de um organismo. Uma vez identificado, um organismo pode ser colocado em um esquema de classificação previamente definido. Os micro-organismos são *identificados* com propósitos práticos – por exemplo, para determinar um tratamento apropriado para uma infecção. Eles não são necessariamente identificados pelas mesmas técnicas pelas quais são *classificados*. A maioria dos procedimentos de identificação é facilmente realizada em um laboratório e utiliza o menor número possível de processos e testes. Os protozoários, os vermes parasitas e os fungos em geral podem ser identificados microscopicamente. A maioria dos organismos procarióticos não tem características morfológicas distintas ou até mesmo variações de tamanho e de forma. Consequentemente, os microbiologistas desenvolveram uma variedade de métodos que testam reações metabólicas e outras características que identificam os procariotos.

O *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* tem sido amplamente utilizado como referência desde a primeira edição, publicada em 1923. O microbiologista americano David Bergey foi o presidente do grupo que compilou as informações sobre bactérias conhecidas a partir de artigos publicados em jornais científicos. O *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9ª ed., 1994) não classifica as bactérias de acordo com a relação evolutiva, mas fornece esquemas de identificação com base em critérios como composição da parede celular, morfologia, coloração diferencial, necessidades de oxigênio e testes bioquímicos.\* A maioria das *Bactérias* e *Arquibactérias* ainda não foi cultivada, e os cientistas estimam que somente 1% desses micro-organismos tenha sido descoberto.

A microbiologia médica (o ramo da microbiologia que trata de patógenos humanos) dominou o interesse em micro-organismos, e este interesse está refletido em muitos esquemas de identificação. Contudo, para colocar as propriedades patogênicas das bactérias em perspectiva, das mais de 2.600 espécies listadas nas *Approved Lists of Bacterial Names*, menos de 10% são patógenos humanos.

Discutiremos a seguir vários critérios e métodos para a classificação e a identificação rotineira dos micro-organismos. Além das propriedades do organismo em si, a fonte e o habitat do isolado bacteriano são considerados como parte do processo de identificação. Em microbiologia clínica, um médico coleta uma amostra de pus ou de superfície tecidual de um paciente. A amostra é introdu-

\* Tanto o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (veja a página 279) quanto o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* são referidos simplesmente como *Bergey's Manual*; os títulos completos são utilizados quando a informação discutida se encontra em um, mas não no outro, por exemplo, uma tabela de identificação.

## Mortalidade em massa de mamíferos marinhos preocupa a microbiologia veterinária

Nas últimas décadas, milhares de mamíferos marinhos morreram sem explicação ao redor do mundo. Essas mortes ocorrem em surtos de dúzias a milhares de mamíferos, e os microbiologistas tentam determinar a causa de cada surto. Em 2007, as mortes de leões-marinhos da Califórnia foram atribuídas à leptospirose, e doenças infecciosas como a toxoplasmose têm matado lontras marinhas da Califórnia em números crescentes. O declínio atual da população de lontras marinhas do Sul é o resultado de uma taxa de mortalidade de 40% decorrente de uma variedade de doenças infecciosas bacterianas. Esse aumento nos índices de mortalidade traz a preocupação de que populações inteiras de mamíferos marinhos possam ser destruídas.

Em 2007, a brucelose matou um golfinho Maui. Ainda mais preocupante é o fato de um grande número de patógenos oportunistas, incluindo 55 espécies de *Vibrio*, ter sido encontrado em golfinhos. Essas bactérias fazem parte da microbiota normal dos golfinhos e da biota das águas costeiras. Elas podem causar doença somente se o sistema imune do animal, sua defesa natural contra infecção, for enfraquecido. *Arca-nobacterium phocae* é um patógeno oportunista que causa uma infecção grave em focas feridas.

O vírus da cinomose focina e o morbilivírus de cetáceo (CM) são responsáveis pela morte de 20.000 mamíferos marinhos nas águas europeias, e por episódios periódicos de mortes em golfinhos nariz de garrafa ao longo da costa Atlântica dos Estados Unidos. Evidências sugerem que baleias-piloto podem ser responsáveis pela transmissão do vírus CM para outras espécies em grandes extensões do oceano.

### As informações são raras

Tais perguntas são uma preocupação da microbiologia veterinária, que até recentemente era um ramo negligenciado da microbiologia médica. Enquanto as doenças de animais como gado, frangos e martas foram estudadas, em parte pela sua disponibilidade aos pesquisadores, a microbiologia dos animais selvagens, especialmente os mamíferos marinhos, é um campo relativamente emergente. Coletar amostras de animais que vivem em oceano aberto e realizar análises bacteriológicas é bastante difícil. Atualmente, os animais estudados são aqueles confinados

(Figura A) ou que vêm à praia para reprodução, como os leões-marinhos do norte.

Os microbiologistas estão identificando as bactérias nos mamíferos marinhos utilizando baterias de testes convencionais (Figura B) e dados genômicos de espécies conhecidas. As bactérias são comparadas com espécies descritas no *Bergey's Manual*, para atribuir um nome a elas ou as identificar. Novas espécies de bactérias têm sido encontradas em mamíferos marinhos utilizando a técnica de FISH (veja a página 292).

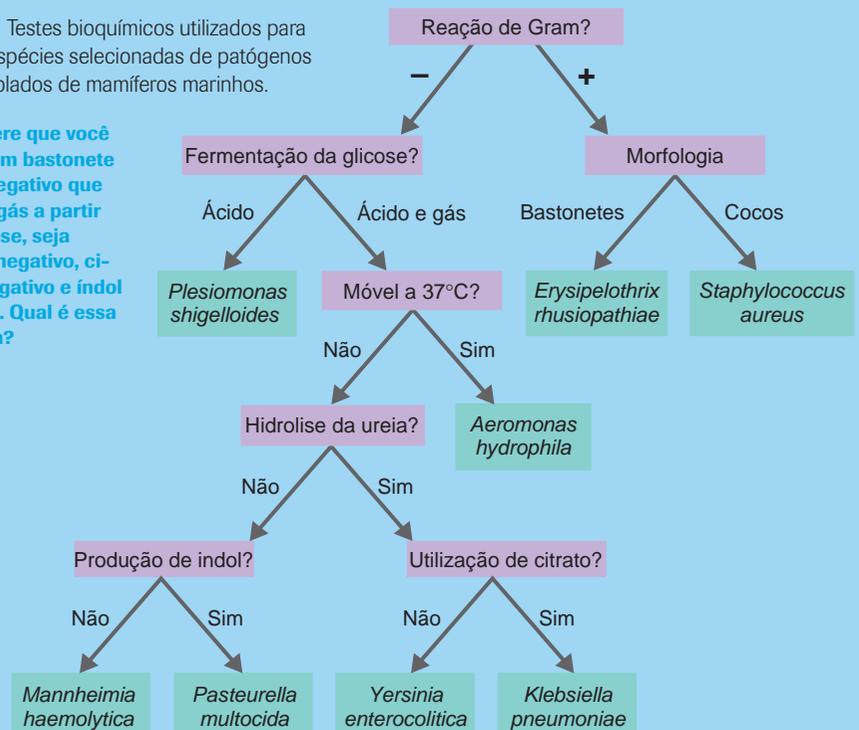
Os microbiologistas veterinários esperam que o aumento dos estudos de microbiologia dos animais selvagens, incluindo os mamíferos marinhos, não somente promova uma melhoria no manejo da vida selvagem como também forneça modelos para o estudo de doenças humanas.



**Figura A** Pesquisadores de mamíferos marinhos examinam um golfinho nariz de garrafa.

**Figura B** Testes bioquímicos utilizados para identificar espécies selecionadas de patógenos humanos isolados de mamíferos marinhos.

**P** Considere que você isolou um bastonete gram-negativo que produz gás a partir da glicose, seja urease negativo, citrato negativo e indol positivo. Qual é essa bactéria?



REQUISIÇÃO MICROBIOLÓGICA		Data:	Hora:	Tira preparada por:
Lab:		Nome do médico:	Coletado por:	RG do paciente:
Data, hora recebida:				
NÃO ESCREVER ABAIXO DESTA LINHA		USE UMA TIRA PARA CADA REQUISIÇÃO		
RESULTADO DA COLORAÇÃO DE GRAM		ORIGEM DO ESPÉCIME	TESTE REQUISITADO	
<input type="checkbox"/> COCOS GRAM-POSITIVOS, GRUPOS <input type="checkbox"/> COCOS GRAM-POSITIVOS, PARES/CADEIAS <input type="checkbox"/> BASTONETES GRAM-POSITIVOS <input checked="" type="checkbox"/> COCOS GRAM-NEGATIVOS <input type="checkbox"/> BASTONETES GRAM-NEGATIVOS <input type="checkbox"/> COCOBACILOS GRAM-NEGATIVOS <input type="checkbox"/> LEVEDURA <input type="checkbox"/> OUTROS	<input type="checkbox"/> SEM CRESCIMENTO <input type="checkbox"/> SEM CRESCIMENTO EM__DIAS <input type="checkbox"/> MICROBIOTA MISTA <input type="checkbox"/> AMOSTRA COLETADA OU TRANSPORTADA DE MANEIRA INCORRETA <input type="checkbox"/> ____TIPOS DIFERENTES DE ORGANISMOS <input type="checkbox"/> NEGATIVO PARA <i>SALMONELLA</i> , <i>SHIGELLA</i> E <i>CAMPYLOBACTER</i> <input type="checkbox"/> OVOS, CISTOS OU PARASITAS NÃO VISUALIZADOS <input checked="" type="checkbox"/> DIPLOCOCOS GRAM-NEGATIVOS, OXIDASE-POSITIVOS <input type="checkbox"/> PRESCRITIVO BETA STREP GRUPO A PELA BACITRALINA	<input type="checkbox"/> SANGUE <input type="checkbox"/> FLUIDO CEREBROSPINAL <input type="checkbox"/> FLUIDO (especificar fonte) _____ <input type="checkbox"/> GARGANTA <input type="checkbox"/> ESCARRO, expectorado <input type="checkbox"/> OUTRO, respiratório (descrever) _____ <input type="checkbox"/> URINA, jato médio <input type="checkbox"/> URINA, cateter de demora <input type="checkbox"/> URINA, cateter reto <input type="checkbox"/> URINA, primeira manhã inteira <input type="checkbox"/> URINA, outros (descrever) _____ <input type="checkbox"/> FEZES <input checked="" type="checkbox"/> GU (especificar fonte) <i>vag.</i> <input type="checkbox"/> ABSCESSO (especificar fonte) _____ <input type="checkbox"/> TECIDO (especificar fonte) _____ <input type="checkbox"/> ULCERAÇÃO (especificar fonte) _____ <input type="checkbox"/> FERIMENTO (especificar fonte) _____ <input type="checkbox"/> TESTE DE ESTERILIDADE	<b>Bacteriano</b> <input type="checkbox"/> <b>Cultura de rotina</b> ; coloração de Gram, cultura anaeróbica, teste de suscetibilidade Strep Gp. A para garganta. <input type="checkbox"/> Cultura de <i>Legionella</i> <input type="checkbox"/> <i>Bartonella</i> <input type="checkbox"/> Hemocultura <b>Outras culturas não rotineiras</b> <input type="checkbox"/> <i>E. coli</i> O157:H7 <input type="checkbox"/> <i>Vibrio</i> <input type="checkbox"/> <i>Yersinia</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>H. ducreyi</i> <input type="checkbox"/> <i>B. pertussis</i> <input type="checkbox"/> Outros _____ <b>Culturas de triagem</b> <input checked="" type="checkbox"/> Gonococos <input type="checkbox"/> Strep Grupo B <input type="checkbox"/> Strep Grupo A <input type="checkbox"/> Outros _____ <input type="checkbox"/> <b>BACILOS ÁCIDO-ÁLCOOL RESISTENTES</b>	<input type="checkbox"/> <b>FÚNGICO</b> <b>VIRAL</b> <input type="checkbox"/> Cultura de rotina <input type="checkbox"/> Herpes simples <input type="checkbox"/> FA direta para _____ <b>PARASITOLOGIA</b> <input type="checkbox"/> Exame para parasitas e ovos intestinais <input type="checkbox"/> Imunoensaio para <i>Giardia</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryptosporidium</i> <input type="checkbox"/> Prep. oxiúrio <input type="checkbox"/> Hemoparasitas <input type="checkbox"/> Concentração de filária <input type="checkbox"/> <i>Trichomonas</i> <input type="checkbox"/> Outros _____ <b>ENSAIO DE TOXINA</b> <input type="checkbox"/> <i>Clostridium difficile</i> <b>DIRETO (Detecção de antígenos)</b> <input type="checkbox"/> Somente antígeno criptocócico-CSF <input type="checkbox"/> Antígenos bacterianos (especificar) _____ <b>ESPECIAL</b> <input checked="" type="checkbox"/> Teste de antimicrobianos (CIM)
Preenchido por uma pessoa		Preenchido por uma pessoa diferente		

**Figura 10.7** Formulário de relatório de laboratório de microbiologia clínica. Em instituições de saúde, morfologia e coloração diferencial são importantes na determinação do tratamento adequado para doenças microbianas. Um clínico completa o formulário para identificação da amostra e testes específicos. Nesse caso, uma amostra geniturinária será examinada para doenças sexualmente transmissíveis. As anotações em vermelho são as indicações do técnico de laboratório para a coloração de Gram e os resultados das culturas. (A concentração inibitória mínima [CIM] de antibióticos será discutida no Capítulo 20, página 572.)

**P** Qual doença é suspeitada se o quadro de bacilos ácido-álcool resistentes é testado?

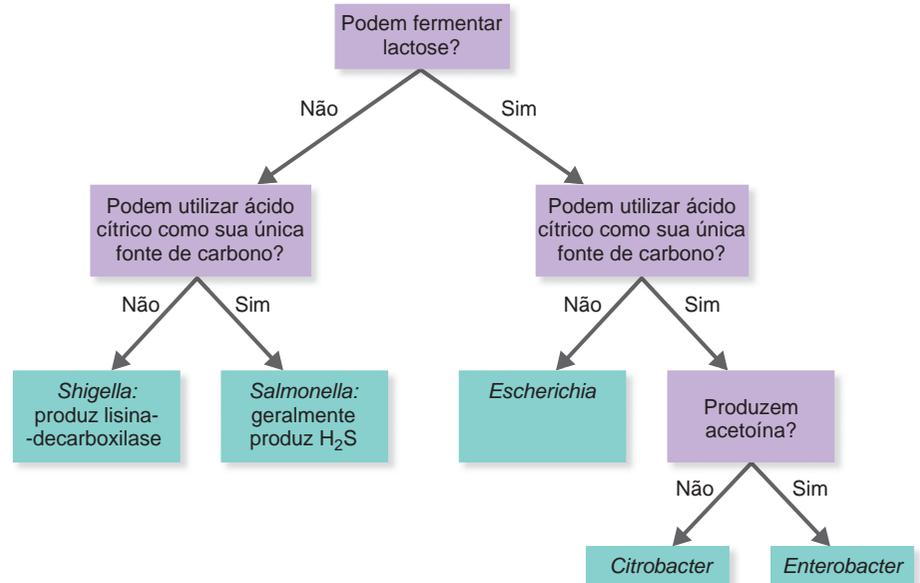
zida em um tubo para transporte. Os meios para transporte em geral não são nutritivos e são projetados para prolongar a viabilidade de patógenos fastidiosos. O médico anota o tipo de espécime e os testes requeridos em um formulário de requisição laboratorial (Figura 10.7). As informações fornecidas pelo técnico de laboratório ajudarão o médico a iniciar o tratamento (veja o quadro no Capítulo 5, página 144).

### Características morfológicas

As características morfológicas (estruturais) têm auxiliado os taxonomistas na classificação de organismos nos últimos 200 anos. Os organismos superiores frequentemente são classificados de acordo com a observação de detalhes anatômicos. Contudo, muitos micro-organismos são muito semelhantes entre si para poderem ser classificados por suas estruturas. No microscópio, organismos que po-

**Figura 10.8** Utilização de características metabólicas para identificar gêneros selecionados de bactérias entéricas.

**P** Considere que você tem uma bactéria gram-negativa que produz ácido a partir de lactose e não pode utilizar o ácido cítrico como única fonte de carbono. Qual é essa bactéria?



dem diferir quanto às suas propriedades metabólicas ou fisiológicas podem parecer iguais. Literalmente centenas de espécies bacterianas são pequenos bastonetes ou pequenos cocos.

**P&R** Contudo, um tamanho maior ou a presença de estruturas intracelulares nem sempre significa uma classificação fácil. A pneumonia por *Pneumocystis* é a infecção oportunista mais comum em pacientes com Aids. Até a epidemia de Aids, o agente responsável por essa infecção, *P. jirovecii* (anteriormente conhecido como *P. carinii*), raramente era visto em seres humanos. *Pneumocystis* não possui estruturas que podem ser facilmente utilizadas para identificação (veja a Figura 24.20, página 698), e sua posição taxonômica tem sido incerta desde a sua descoberta em 1909 por Carlos Chagas em camundongos. Embora tenha sido classificado como um protozoário, estudos recentes comparando a sequência de seu rRNA com a de outros protozoários, *Euglena*, fungos celulares gelatinosos, plantas, mamíferos e fungos mostraram que *Pneumocystis* é na realidade um membro do Reino *Fungi*. Pesquisadores cultivaram *Pneumocystis* e desenvolveram alguns tratamentos úteis para a pneumonia causada por ele. Se os pesquisadores considerarem o parentesco desse organismo com os fungos, tratamentos apropriados serão obtidos.

A morfologia celular nos diz pouco sobre as relações filogenéticas. Contudo, as características ainda auxiliam na identificação de bactérias. Por exemplo, diferenças em estruturas como os endosporos ou os flagelos podem ser úteis.

## Coloração diferencial

Relembre do Capítulo 3 que um dos primeiros passos para identificar bactérias é a coloração diferencial. A maioria das bactérias é gram-positiva ou gram-negativa. Outras colorações diferenciais, como a coloração ácido-álcool resistente, podem ser úteis para um grupo mais limitado de micro-organismos. Lembre-se de que essas colorações têm como base a composição química das paredes celulares e, portanto, não são úteis para as bactérias sem paredes ou para as arqueobactérias com paredes incomuns. O exame microscópico de

uma coloração de Gram ou de uma coloração ácido-álcool resistente é utilizado para obter informações rápidas no ambiente clínico.

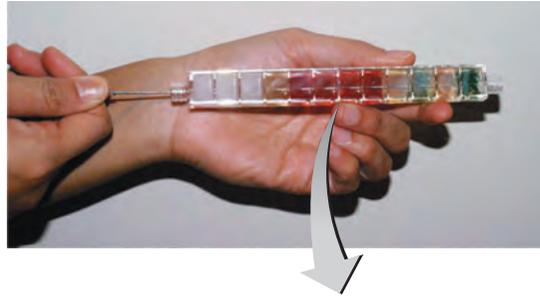
## Testes bioquímicos

As atividades enzimáticas são amplamente utilizadas para diferenciar as bactérias. Mesmo bactérias intimamente relacionadas em geral podem ser separadas em espécies distintas após serem submetidas a testes bioquímicos, como a determinação da capacidade de fermentar um conjunto de carboidratos selecionados. Como um exemplo da utilização de testes bioquímicos para identificar bactérias (nesse caso, em mamíferos marinhos), veja o quadro na página 283. Além disso, os testes bioquímicos podem fornecer informações sobre o nicho da espécie no ecossistema. Por exemplo, uma bactéria que possa fixar o gás nitrogênio ou oxidar o enxofre elementar fornecerá nutrientes importantes para plantas e animais. Isso será discutido no Capítulo 27.

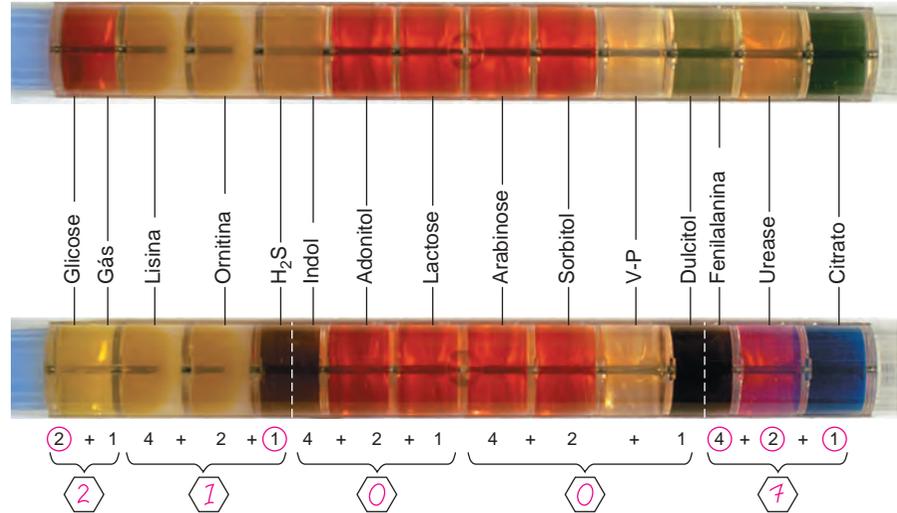
As bactérias gram-negativas entéricas são um grupo amplo e heterogêneo de micro-organismos cujo habitat natural é o trato intestinal de humanos e de outros animais. Essa família contém muitos patógenos que causam doenças diarreicas. Vários testes foram desenvolvidos para que os técnicos identifiquem rapidamente os patógenos, os médicos forneçam um tratamento apropriado e os epidemiologistas localizem a fonte da doença. Todos os membros da família *Enterobacteriaceae* são oxidase-negativos. Entre as bactérias entéricas estão membros dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Citrobacter* e *Salmonella*. *Escherichia*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, que podem fermentar a lactose para produzir ácido e gás, podem ser diferenciados de *Salmonella* e *Shigella*, que não podem. Outros testes bioquímicos, como mostrado na Figura 10.8, podem diferenciar os gêneros.

O tempo necessário para identificar bactérias pode ser reduzido consideravelmente com a utilização de meios seletivos e diferenciais ou métodos rápidos de identificação. Lembre-se do Capítulo 6 (página 168) que os meios seletivos contêm ingredientes que inibem o crescimento de organismos competidores e favorecem o

1 Um tubo contendo meio para 15 testes bioquímicos é inoculado com uma bactéria entérica desconhecida.



2 Após incubação, é feita a leitura dos resultados.



3 O valor para cada teste positivo é circulado, e os números de cada grupo de testes são somados para fornecerem o código numérico ID.

4 A comparação do código ID com uma lista de nomes computadorizada mostra que o organismo é *Proteus mirabilis*.

Código ID	Organismo	Resultados atípicos	Teste confirmatório
21006	<i>Proteus mirabilis</i>	Ornitina <sup>-</sup>	Sacarose
21007	<i>Proteus mirabilis</i>	Ornitina <sup>-</sup>	
21020	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Lisina <sup>-</sup>	

**Figura 10.9 Tipo de método de identificação rápida para bactérias: Enterotubo II da Becton Dickinson.** Este exemplo mostra os resultados para uma linhagem típica de *P. mirabilis*; contudo, outras linhagens podem produzir resultados diferentes para os testes que estão listados na coluna de Resultados Atípicos. O teste V-P é utilizado para confirmar uma identificação.

**P Como uma espécie pode ter dois códigos ID diferentes?**

crescimento dos organismos de interesse, e os meios diferenciais permitem que o micro-organismo desejado forme uma colônia que pode ser distinguida.

O *Bergey's Manual* não avalia a importância relativa de cada teste bioquímico e não descreve sempre as linhagens. Ao diagnosticar uma infecção, o médico deve identificar uma espécie em particular e até uma linhagem específica para prosseguir com o tratamento apropriado. Para isso, séries específicas de testes bioquímicos foram desenvolvidas para a identificação rápida em laboratórios hospitalares. Sistemas de testes rápidos foram desenvolvidos para leveduras e outros fungos, assim como para bactérias.

**Métodos rápidos de identificação** são produzidos para grupos de bactérias de importância médica, como as entéricas. Tais

ferramentas são projetadas para realizar vários testes bioquímicos simultaneamente e podem identificar bactérias em 4 a 24 horas. Isso algumas vezes é chamado de **identificação numérica** porque os resultados de cada teste correspondem a um número. Na forma mais simples, a um teste positivo pode ser dado o valor 1 e a um teste negativo, o valor 0. Na maioria dos kits comerciais de testes, os resultados correspondem a números na faixa de 1 a 4, com base na confiabilidade e importância relativa de cada teste, e o resultado total é comparado com um banco de dados de organismos conhecidos.

No exemplo mostrado na **Figura 10.9**, uma bactéria entérica desconhecida é inoculada em um tubo projetado para realizar 15 testes bioquímicos. Após incubação, os resultados em cada compartimento são registrados. Observe que para cada resultado é de-

**Figura 10.10 Um teste de aglutinação em lâmina.** (a) Em um teste positivo, a aparência granulada se deve ao agrupamento (aglutinação) de bactérias. (b) Em um teste negativo, as bactérias ainda estão distribuídas de maneira homogênea em salina e antissoro.

**P** A aglutinação ocorre quando as bactérias são misturadas com \_\_\_\_\_.

signado um valor; o número resultante da soma de todos os testes é chamado de código ID. A fermentação da glicose é importante, e para uma reação positiva é dado o valor 2, em comparação com a produção de acetoina (teste V-P, ou teste de Voges-Proskauer), que não tem valor.

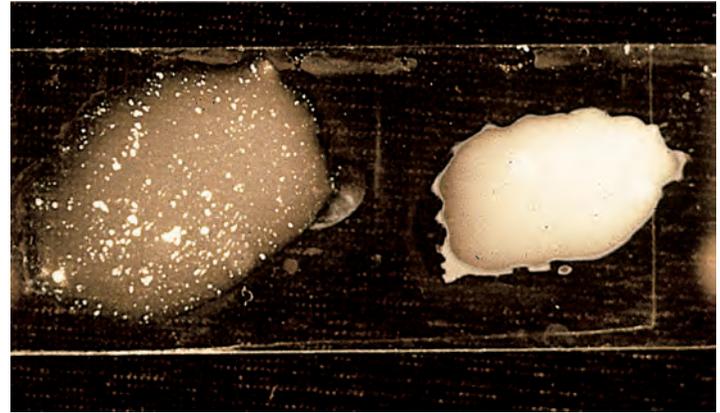
Uma interpretação computadorizada dos resultados simultâneos dos testes é essencial e é fornecida pelo fabricante. Uma limitação dos testes bioquímicos é que as mutações e a aquisição de plasmídeos podem resultar em linhagens com características diferentes. A menos que um grande número de testes seja utilizado, um organismo pode ser identificado de maneira incorreta.

## Sorologia

A **sorologia** é a ciência que estuda o soro e as respostas imunológicas que são evidenciadas no soro (veja o Capítulo 18). Os micro-organismos são antigênicos; ou seja, aqueles que entram no corpo animal estimulam a formação de anticorpos. Os anticorpos são proteínas que circulam no sangue e se combinam de maneira altamente específica com as bactérias que causaram a sua produção. Por exemplo, o sistema imune de um coelho inoculado com as bactérias mortas da febre tifoide (antígeno) responde com a produção de anticorpos contra as bactérias da tifoide. Soluções de tais anticorpos utilizadas para identificar muitos micro-organismos de importância médica estão disponíveis comercialmente; essa solução é chamada de **antissoro**. Se uma bactéria desconhecida é isolada de um paciente, ela pode ser testada com um antissoro conhecido e com frequência é identificada rapidamente.

Em um procedimento chamado de **teste de aglutinação em lâmina**, amostras de uma bactéria desconhecida são colocadas em uma gota de solução salina em várias lâminas. A seguir, diferentes antissoros conhecidos são adicionados a cada amostra. As bactérias aglutinam (agregam) quando misturadas com anticorpos que são produzidos em resposta a essa espécie ou linhagem de bactéria; um teste positivo é indicado pela presença de aglutinação. Testes de aglutinação em lâmina positivos e negativos são mostrados na **Figura 10.10**.

Os **testes sorológicos** podem diferenciar não somente espécies microbianas, mas também linhagens dentro de uma espécie. As linhagens com antígenos diferentes são chamadas de **sorotipos**, **sorovares** ou **biovares**. Veja a discussão sobre sorovares de *Escherichia* e *Salmonella* na página 310. Como mencionado no Capítulo 1, Rebecca Lancefield foi capaz de classificar os sorotipos dos estreptococos pelo estudo de suas reações sorológicas. Ela descobriu que os diferentes antígenos nas paredes celulares de vários sorotipos de estreptococos estimulam a formação de diferentes anticorpos. Por outro lado, como bactérias intimamente relacionadas produzem alguns dos mesmos antígenos, os testes sorológicos podem ser uti-



(a) Teste positivo

(b) Teste negativo

lizados para triagem de isolados bacterianos pelas possíveis similaridades. Se um antissoro reage com as proteínas de diferentes espécies ou linhagens bacterianas, essas bactérias podem ser testadas posteriormente para outras similaridades.

O teste sorológico foi utilizado para determinar se o aumento no número de casos de fasciite necrosante nos Estados Unidos e na Inglaterra desde 1987 era devido a uma fonte comum de infecção. Nenhuma fonte comum foi encontrada, mas houve um aumento nos dois sorotipos de *Streptococcus pyogenes*, que foram denominadas bactérias “comedoras de carne”.

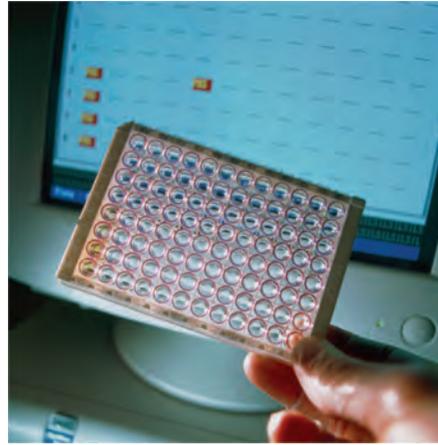
Um teste chamado de **imunoensaio enzimático (ELISA, de enzyme-linked immunosorbent assay)** é amplamente utilizado porque é rápido e pode ser lido por um computador (**Figura 10.11**; veja também a Figura 18.14, página 518). Em um ELISA direto, anticorpos conhecidos são colocados em canaletas de uma microplaca, e um tipo desconhecido de bactéria é adicionado a cada canaleta. A reação entre os anticorpos conhecidos e as bactérias fornece uma identificação das bactérias. Um ELISA é utilizado no diagnóstico de Aids para detectar a presença de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus que causa a Aids (veja a Figura 19.13, página 540).

Outro teste sorológico, o **Western blotting**, é utilizado para identificar anticorpos no soro de um paciente (**Figura 10.12**). A infecção por HIV é confirmada pelo *Western blotting*, e a doença de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi*, frequentemente é diagnosticada por *Western blot*.

- 1 Proteínas de uma bactéria ou vírus conhecido são separadas por uma corrente elétrica em uma eletroforese.
- 2 As proteínas são a seguir transferidas para um filtro por uma corrente elétrica.
- 3 O soro do paciente é lavado sobre o filtro. Se o paciente tiver anticorpos para uma das proteínas do filtro (nesse caso, proteínas de *Borrelia*), os anticorpos e as proteínas combinarão. Um soro anti-humano ligado a uma enzima é a seguir lavado sobre o filtro.
- 4 Isso será visualizado como uma banda colorida sobre o filtro após adição do substrato de enzima.



(a)



(b)

**Figura 10.11** Teste de ELISA. (a) Um técnico utiliza uma micropipeta para adicionar as amostras em uma microplaca para ELISA. (b) Os resultados do ELISA são lidos pelo computador.

**P** Quais são as similaridades entre o teste de aglutinação em lâmina e o teste de ELISA?

## Fagotipagem

Assim como o teste sorológico, a fagotipagem procura similaridades entre as bactérias. Ambas as técnicas são úteis em localizar a origem e seguir o curso do surto de uma doença. A **fagotipagem** é um teste para determinar a qual fago uma bactéria é suscetível. Lembre-se do Capítulo 8 (página 237) que os bacteriófagos (fagos) são vírus bacterianos que geralmente causam a lise das células bacterianas infectadas por eles. São altamente especializados, pois infectam somente membros de uma espécie particular, ou mesmo linhagens particulares dentro de uma espécie. Uma linhagem bacteriana pode ser suscetível a dois fagos diferentes, enquanto outra linhagem da mesma espécie pode ser suscetível a esses dois fagos mais um terceiro. Os bacteriófagos serão discutidos no Capítulo 13.

As fontes de infecções associadas a alimentos podem ser seguidas por fagotipagem. Uma versão desse procedimento começa com uma placa totalmente recoberta por bactérias crescendo em ágar. Uma gota de cada tipo diferente de fago é colocada sobre a bactéria. Se os fagos forem capazes de infectar e lisar as células bacterianas, ocorrerá falha do crescimento bacteriano (chamada de placa de lise) (**Figura 10.13**). Esse teste mostra, por exemplo, que bactérias isoladas de um corte cirúrgico têm o mesmo perfil de sensibilidade ao fago que aquelas isoladas do cirurgião ou das enfermeiras. Esse resultado estabelece que o cirurgião ou a enfermeira é a fonte da infecção.

## Perfil de ácidos graxos

As bactérias sintetizam uma ampla variedade de ácidos graxos, e em geral eles são constantes para uma espécie em particular. Sistemas comerciais têm sido projetados para separar os ácidos graxos celulares e os comparar com o perfil de ácidos graxos de organismos conhecidos. Perfis de ácidos graxos, chamados de FAME (*fatty acid methyl ester*), são amplamente utilizados em laboratórios clínicos e de saúde pública.

## Citometria de fluxo

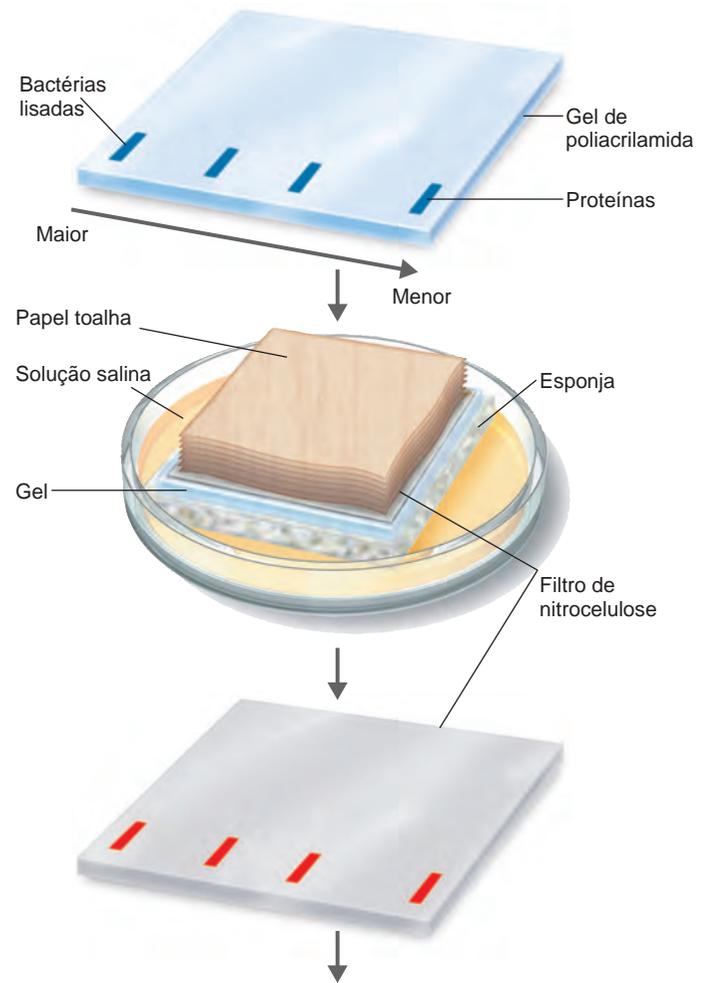
A **citometria de fluxo** pode ser utilizada para identificar bactérias em uma amostra sem a necessidade de cultivo. Em um *citômetro de fluxo*, um fluido em movimento contendo as bactérias é pressionado através de uma pequena abertura (veja a Figura 18.12, página 516). O método mais simples detecta a presença das bactérias pela diferença da condutividade elétrica entre as células e o meio ambiente. Se o fluido passando através da abertura é iluminado por um *laser*, a dispersão da luz fornece informações sobre o tamanho, a forma, a densidade e a superfície da célula, que serão analisadas por um computador. A fluorescência pode ser utilizada para detectar células naturalmente fluorescentes, como *Pseudomonas*, ou células marcadas com corantes fluorescentes.

O leite pode ser um veículo de transmissão de doenças. Um teste que utilize a citometria de fluxo para detectar *Listeria* no leite poderia economizar tempo, uma vez que a bactéria não precisaria ser cultivada para identificação. Os anticorpos contra *Listeria* podem ser marcados com um corante fluorescente e adicionados ao leite a ser testado. O leite é passado através do citômetro de fluxo, que registra a fluorescência das células marcadas com anticorpos.

## Composição de bases do DNA

Os taxonomistas podem utilizar a **composição de bases do DNA** de um organismo para tirar conclusões sobre parentesco. Essa composição de bases geralmente é expressa como a porcentagem de guanina mais citosina (G + C). A composição de bases de uma única espécie teoricamente é uma propriedade fixa; portanto, uma comparação do conteúdo G + C em diferentes espécies pode revelar seu grau de parentesco. Como vimos no Capítulo 8, cada guanina (G) no DNA tem uma citosina (C) complementar. De maneira similar, cada adenina (A) no DNA tem uma timina (T) complementar. Portanto, a porcentagem de bases de DNA que são pares GC nos fornece a porcentagem de pares AT (GC + AT = 100%). Dois orga-

- 1 Se a doença de Lyme é suspeita em um paciente, a eletroforese é utilizada para separar as proteínas de *Borrelia burgdorferi* no soro. As proteínas se movem em velocidades diferentes em função de sua carga e tamanho quando o gel é exposto a uma corrente elétrica.
- 2 As bandas são transferidas para um filtro de nitrocelulose por *blotting*. Cada uma delas consiste em muitas moléculas de uma proteína particular (antígeno). As bandas ainda não são visíveis neste ponto.
- 3 As proteínas (antígenos) são posicionadas no filtro exatamente como estavam no gel. O filtro é a seguir lavado com o soro do paciente, seguido por anticorpos anti-humanos conjugados com uma enzima. Os anticorpos do paciente que combinam com seu antígeno específico são visíveis (mostrados aqui em vermelho) quando o substrato da enzima é adicionado.
- 4 O teste está pronto. Se os anticorpos conjugados se fixam no filtro, evidências da presença do micro-organismo em questão – nesse caso, *B. burgdorferi* – foram encontradas no soro do paciente.



**Figura 10.12 Western blot.** As proteínas separadas por eletroforese podem ser detectadas por suas reações com os anticorpos.

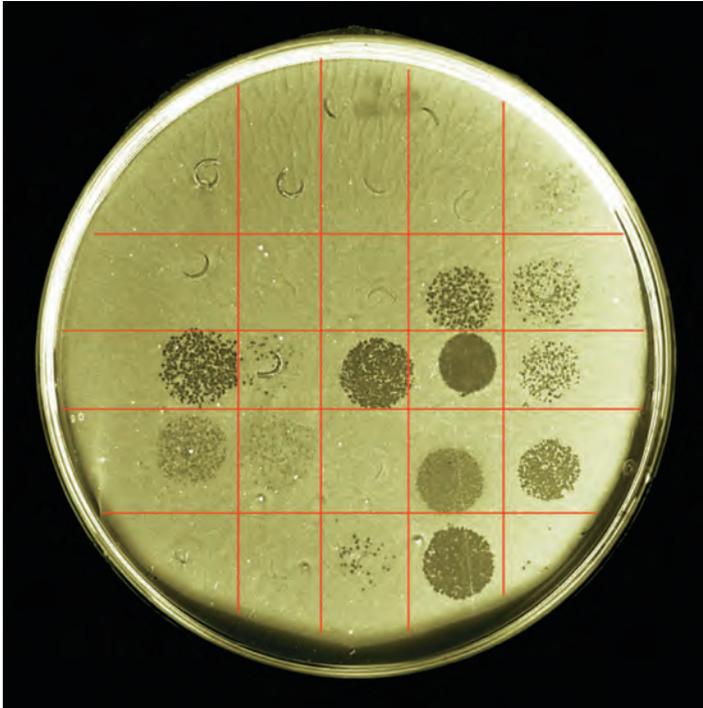
**P** Dê o nome de duas doenças que podem ser diagnosticadas por *Western blotting*.

nismos que são intimamente relacionados e, portanto, têm muitos genes idênticos ou similares terão quantidades similares de várias bases de seu DNA. Contudo, se há uma diferença de mais de 10% na sua porcentagem de pares de GC (p. ex., se o DNA de uma bactéria contém 40% de GC e o de outra tem 60% de GC), então esses dois organismos provavelmente não são relacionados. É claro que dois organismos que tenham a mesma porcentagem de GC não necessa-

riamente são intimamente relacionados; outros dados são necessários para se tirar conclusões sobre suas relações filogenéticas.

### Fingerprinting de DNA

Na verdade, determinar a sequência inteira de bases do DNA de um organismo agora é possível com métodos bioquímicos modernos, mas isso é impraticável para a identificação laboratorial



**Figura 10.13 Fagotipagem de uma linhagem de *Salmonella enterica*.** A linhagem testada foi cultivada por toda a placa. Falhas, ou áreas de lise, foram produzidas pelos bacteriófagos, indicando que a linhagem era sensível à infecção por esses fagos. A fagotipagem é utilizada para distinguir sorotipos de *S. enterica* e tipos de *Staphylococcus aureus*.

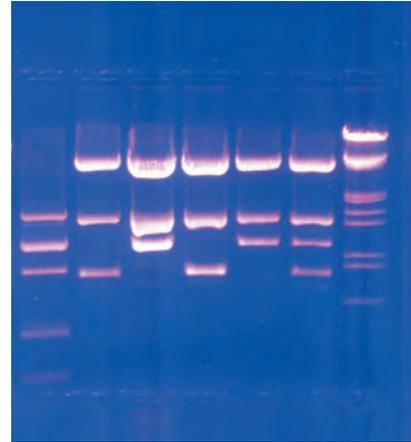
#### P O que é identificado na fagotipagem?

por causa da grande quantidade de tempo necessário. Contudo, a utilização de enzimas de restrição permitiu aos pesquisadores comparar as sequências de bases de organismos diferentes. As enzimas de restrição cortam uma molécula de DNA cada vez que uma sequência de bases específica ocorre, produzindo fragmentos de restrição (como discutido no Capítulo 9, página 249). Por exemplo, a enzima *EcoRI* corta o DNA no local da seta na sequência



Nessa técnica, o DNA de dois organismos é tratado com a mesma enzima de restrição, e os fragmentos de restrição (RFLPs) produzidos são separados por eletroforese (veja a Figura 9.17, página 264). A comparação do número e do tamanho dos fragmentos de restrição produzidos pelos diferentes organismos fornece informações sobre suas similaridades e diferenças genéticas; quanto mais similares forem os perfis, ou o *fingerprinting* do DNA, mais intimamente relacionados deverão ser os organismos.

O *fingerprinting* de DNA é utilizado para determinar a fonte de infecções hospitalares. Em um hospital, pacientes submetidos à cirurgia de desvio de coronária desenvolveram infecções causadas por *Rhodococcus bronchialis*. O *fingerprinting* de DNA das bactérias



**Figura 10.14 Fingerprinting de DNA.** Os plasmídeos de sete bactérias diferentes foram clivados com a mesma enzima de restrição. Cada produto de clivagem foi colocado em uma canaleta diferente (origem) do gel de agarose. Uma corrente elétrica foi aplicada a seguir no gel para separar os fragmentos por tamanho e carga elétrica. O DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídio, que fica fluorescente sob luz ultravioleta. A comparação das canaletas mostra que nenhuma das amostras de DNA (e, portanto, nenhuma bactéria) é idêntica.

#### P O que é um RFLP?

dos pacientes e da bactéria isolada de uma das enfermeiras foi idêntico. O hospital foi então capaz de quebrar a cadeia de transmissão dessa infecção recomendando à enfermeira a utilização de técnicas de assepsia. O uso de *fingerprinting* de DNA para localizar a fonte de diarreia associada a tomate é descrito no quadro do Capítulo 25, na página 715.

### Reação em cadeia da polimerase

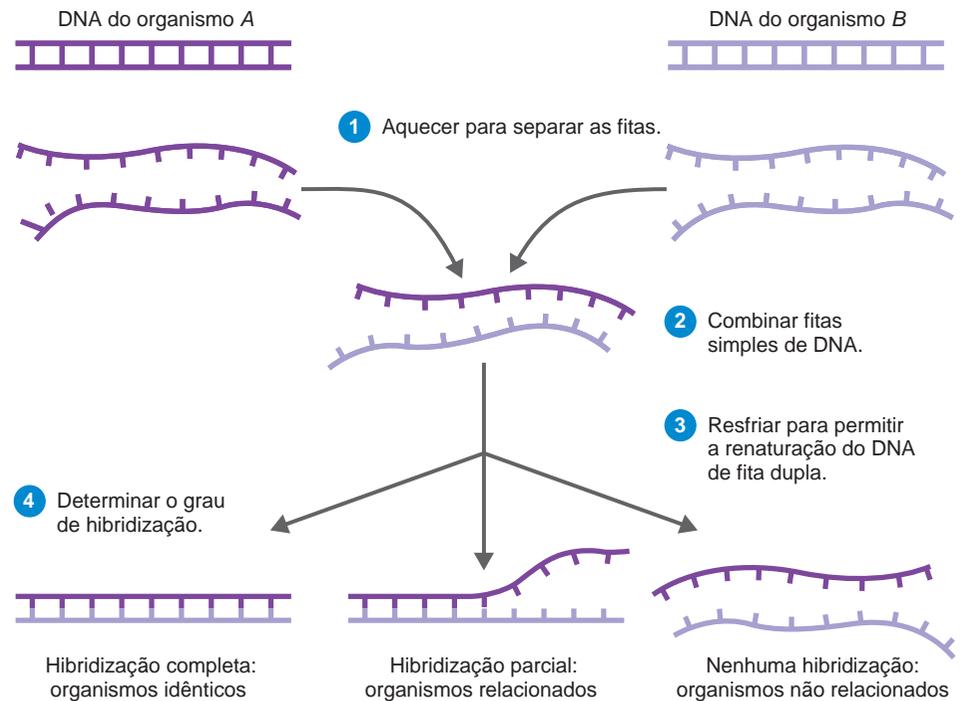
Quando um micro-organismo não pode ser cultivado por métodos convencionais, o agente responsável por uma doença infecciosa talvez não possa ser identificado. Contudo, uma técnica chamada de **reação em cadeia da polimerase (PCR, de Polymerase Chain Reaction)** pode ser utilizada para aumentar a quantidade de DNA microbiano em níveis que possam ser testados por eletroforese em gel (veja o Capítulo 9, página 251). Se um iniciador para um micro-organismo específico é utilizado, a presença de DNA amplificado indica que o micro-organismo está presente.

Em 1992, pesquisadores utilizaram a PCR para determinar o agente responsável pela doença de Whipple, que era uma bactéria previamente desconhecida, agora denominada *Tropheryma whippelii*. A doença de Whipple foi descrita em 1907, por George Whipple, como um distúrbio dos sistemas gastrointestinal e nervoso causado por um bacilo desconhecido. Ninguém foi capaz de cultivar a bactéria para permitir sua identificação, e assim a PCR fornece o único método confiável de diagnóstico e tratamento para esta doença.

Nos últimos anos, a PCR permitiu várias descobertas. Por exemplo, em 1992, Raul Cano utilizou a PCR para amplificar o DNA da bactéria *Bacillus* do âmbar, que tinha de 25 a 40 milhões

**Figura 10.15 Hibridização DNA-DNA.** Quanto maior a quantidade de pareamento entre as fitas de DNA de organismos diferentes (hibridização), mais intimamente relacionados estão os organismos.

**P** Qual é a base teórica das sondas de DNA?



de anos. Os iniciadores foram feitos a partir da sequência de rRNA de *B. circulans*, para amplificar o DNA que codifica o rRNA da bactéria no âmbar. Esses iniciadores vão amplificar o DNA de outras espécies de *Bacillus*, mas não amplificam o DNA de outras bactérias que poderiam estar presentes, como *Escherichia* ou *Pseudomonas*. O DNA foi sequenciado após amplificação. Essa informação foi utilizada para determinar as relações entre as bactérias antigas e as atuais.

Em 1993, os microbiologistas identificaram o *Hantavirus* como a causa de uma febre hemorrágica no sudoeste da América utilizando a PCR. A identificação foi feita em um tempo recorde – menos de duas semanas. A PCR foi utilizada em 1994 para identificar o agente responsável por uma nova doença transmitida por carrapatos (erliquiose granulocítica humana), a bactéria *Ehrlichia chaffeensis* (página 654). A PCR também é utilizada para identificar a fonte do vírus da raiva; veja o quadro no Capítulo 22 (página 625).

TaqMan é um sistema comercial que utiliza a PCR para identificar *E. coli* patogênica em alimentos e na água. Com esse sistema, o novo DNA amplificado de *E. coli* fluoresce e pode ser detectado por meio de eletroforese em gel.

## Hibridização de ácidos nucleicos

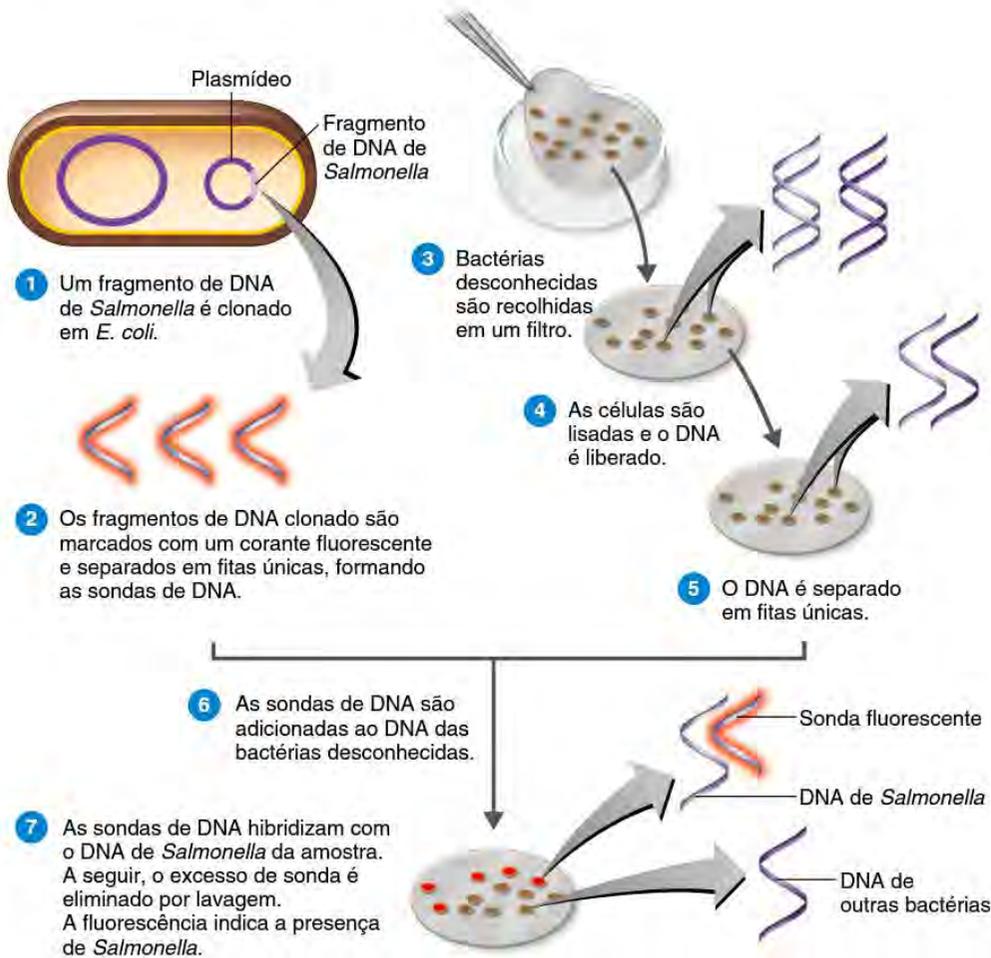
Se uma molécula de fita dupla de DNA é exposta ao calor, as fitas complementares se separam assim que as ligações de hidrogênio se quebram. Se as fitas simples são então resfriadas lentamente, elas irão se unir novamente para formar uma molécula de fita dupla idêntica à fita dupla original. (Essa união ocorre porque as fitas simples têm sequências complementares.) Quando essa técnica é aplicada para separar fitas de DNA de dois organismos

diferentes, é possível determinar a extensão de similaridade entre as sequências de bases dos dois organismos. Esse método é conhecido como **hibridização de ácidos nucleicos**. O procedimento considera que, se duas espécies são similares ou relacionadas, uma porção maior das sequências dos seus ácidos nucleicos também será similar. O método mede a habilidade das fitas de DNA de um organismo de hibridizar (ligar-se por pareamento de bases complementares) com as fitas de DNA de outro organismo (Figura 10.15). Quanto maior o grau de hibridização, maior o grau de parentesco.

Reações similares de hibridização podem ocorrer entre qualquer cadeia de fita simples de ácidos nucleicos: DNA-DNA, RNA-RNA, DNA-RNA. Um RNA transcrito irá hibridizar com o molde separado de DNA para formar uma molécula híbrida DNA-RNA. As reações de hibridização de ácidos nucleicos são a base de diversas técnicas (descritas a seguir) utilizadas para detectar a presença de micro-organismos e identificar organismos desconhecidos.

### Southern blotting

A hibridização de ácidos nucleicos pode ser utilizada para identificar micro-organismos desconhecidos por **Southern blotting** (veja a Figura 9.16, página 263). Além disso, métodos rápidos de identificação utilizando **sondas de DNA** estão sendo desenvolvidos. Um dos métodos envolve a quebra de DNA extraído de *Salmonella* em fragmentos por uma enzima de restrição, e então selecionar um fragmento específico para ser a sonda de identificação da *Salmonella* (Figura 10.16). Esse fragmento deve ser capaz de hibridizar com o DNA de todas as linhagens de *Salmonella*, mas não com o DNA de outras bactérias entéricas relacionadas.



**Figura 10.16 Sonda de DNA utilizada para a identificação de uma bactéria.** O *Southern blotting* é utilizado para detectar um DNA específico. Essa modificação do *Southern blotting* é utilizada para detectar *Salmonella*.

**P** Por que a sonda de DNA e o DNA celular hibridizam?

### Chips de DNA

Uma tecnologia nova e excitante é o **chip de DNA**, que permite detectar rapidamente um patógeno no hospedeiro pela identificação de um gene específico deste patógeno (Figura 10.17). O chip de DNA é composto de sondas de DNA. Uma amostra contendo DNA de um organismo desconhecido é marcada com um corante fluorescente e adicionada ao chip. A hibridização entre a sonda de DNA e o DNA na amostra é detectada por fluorescência.

### Ribotipagem e sequenciamento de RNA ribossômico

A **ribotipagem** atualmente é utilizada para determinar as relações filogenéticas entre os organismos. Existem várias vantagens de se usar o rRNA. Primeiro, todas as células contêm ribossomos. Segundo, genes de rRNA têm sofrido poucas mudanças ao longo do tempo, de modo que todos os membros de um domínio, filo e, em certos casos, gênero têm a mesma “assinatura” em termos de sequências do seu rRNA. O rRNA utilizado com mais frequência é um componente da menor porção dos ribossomos. Uma terceira vantagem do sequenciamento de rRNA é que as células não precisam ser cultivadas em laboratório.

O DNA pode ser amplificado por PCR utilizando um iniciador de RNA para as sequências específicas de assinatura. Os frag-

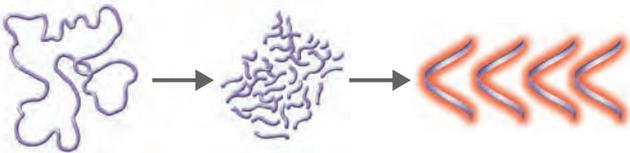
mentos amplificados são posteriormente cortados com uma ou mais enzimas de restrição e separados por eletroforese. Os perfis de bandas resultantes podem ser comparados. A seguir, os genes de rRNA nos fragmentos amplificados podem ser sequenciados para determinar as relações evolutivas entre os organismos. Essa técnica é útil para classificar um organismo recentemente descoberto com relação ao domínio ou filo, ou para determinar os tipos gerais de organismos presentes em um ambiente. Contudo, mais sondas específicas (veja a página 291) são necessárias para identificar espécies individuais.

### Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

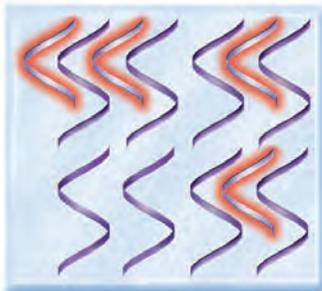
Sondas de RNA ou DNA marcadas com corante fluorescente são utilizadas para corar especificamente micro-organismos no local, *in situ*. Essa técnica é chamada de **hibridização fluorescente *in situ*** (FISH, de *fluorescent in situ hybridization*). As células são tratadas de maneira que a sonda entre na célula e reaja com o ribossomo-alvo na célula (*in situ*). A FISH é utilizada para determinar a identidade, a quantidade e a atividade relativa de micro-organismos em um ambiente, podendo ser utilizada também para detectar bactérias que ainda não foram cultivadas. Utilizando a FISH, uma bactéria minúscula, *Pelagibacter*, foi descoberta no oceano, estando



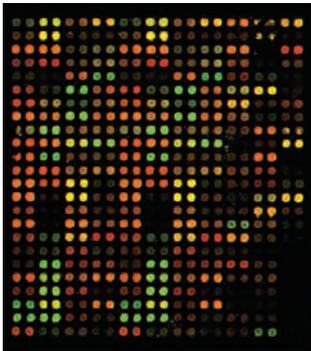
(a) Um chip de DNA pode ser fabricado para conter centenas de milhares de seqüências de DNA de fitas simples sintéticas. Considere que cada seqüência de DNA é exclusiva para um gene diferente.



(b) DNA desconhecido de um paciente é separado em fitas simples, cortado enzimaticamente e marcado com um corante fluorescente.



(c) O DNA desconhecido é inserido no chip e se hibridiza com o DNA no chip.



(d) O DNA marcado vai se ligar somente com o DNA complementar no chip. O DNA ligado vai ser detectado pela sua fluorescência e analisado por um computador. A luz vermelha é um gene expresso em células normais, a luz verde é um gene mutado expresso em células tumorais e a luz amarela, em ambas as células.

**Figura 10.17 Tecnologia do chip de DNA.** A tecnologia do chip de DNA possibilitará uma análise mais rápida e barata, utilizando muito mais sondas. A tecnologia do chip é nova; contudo, os cientistas esperam utilizar em breve os chips de DNA para detectar micro-organismos em amostras humanas ou ambientais, identificar genes tumorais, identificar suspeitos potenciais em um crime ou vítimas de um crime ou de uma catástrofe, identificar espécies em risco de extinção e encontrar doadores de órgão. Se o chip de DNA em (d) foi construído com DNA bacteriano diferente, cada ponto representaria uma bactéria, e os pontos apresentando luz fluorescente identificariam a bactéria na amostra.

**P** o que permite a especificidade do chip a uma bactéria em particular?

relacionada com as riquetsias (página 303). As sondas são desenvolvidas para que a FISH possa detectar bactérias em água potável ou em um paciente antes das 24 horas ou mais normalmente requeridas para o cultivo bacteriano (Figura 10.18).

## Unindo os métodos de classificação

As características morfológicas, as colorações diferenciais e os testes bioquímicos eram as únicas ferramentas de identificação disponíveis até pouco tempo atrás. Avanços tecnológicos estão tornando possível a utilização das técnicas de análise de ácidos nucleicos, antes reservadas para a classificação, como rotina para identificação. Informações obtidas sobre micro-organismos são utilizadas para identificar e classificar os organismos. Dois métodos de utilização dessas informações são descritos a seguir.

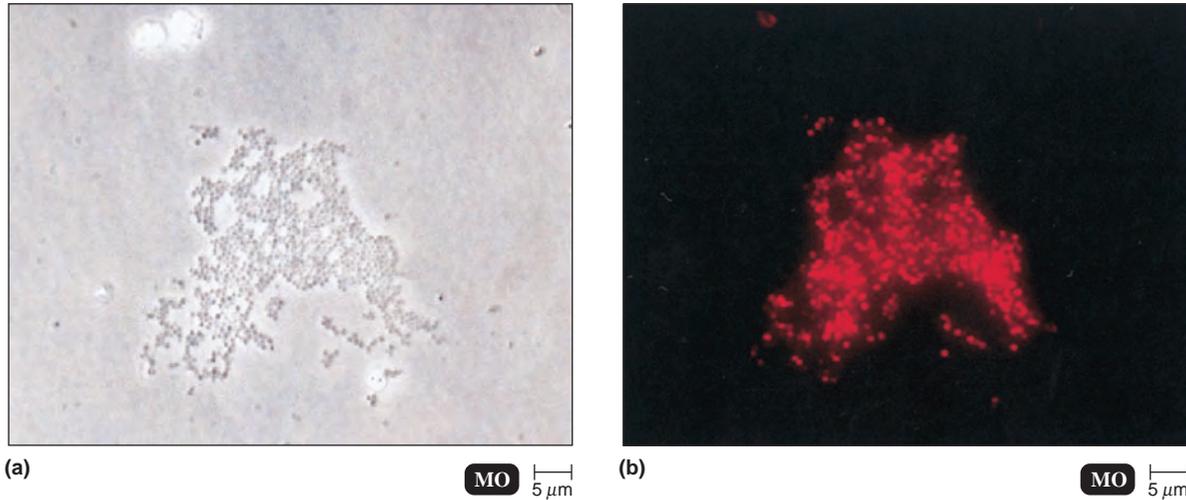
### Chaves dicotômicas

As **chaves dicotômicas** são amplamente utilizadas para identificação. Em uma chave dicotômica, a identificação tem como base perguntas sucessivas, e cada pergunta tem duas respostas possíveis (dicotômico significa cortado em dois). Após responder uma das questões, o pesquisador é direcionado à outra questão até que o organismo seja identificado. Embora essas chaves tenham pouco a ver com relações filogenéticas, elas são valiosas para a identificação. Por exemplo, a chave dicotômica para uma bactéria poderia começar com uma característica facilmente determinável, tal como a forma da célula, e ir para sua capacidade de fermentar um açúcar. As chaves dicotômicas são mostradas na Figura 10.8 e no quadro da página 283.

### Cladogramas

Os **cladogramas** são mapas que mostram as relações evolutivas entre os organismos. Cladogramas são mostrados nas Figuras 10.1 e 10.6. Cada bifurcação do ramo é definida por uma característica compartilhada por várias espécies daquele ramo. Historicamente, os cladogramas para vertebrados são feitos utilizando evidências de fósseis. Anteriormente, a maioria dos micro-organismos não deixou fósseis; portanto, o sequenciamento de rRNA é utilizado principalmente para montar cladogramas para micro-organismos. A menor subunidade de rRNA utilizada tem 1.500 bases, e os programas de computador fazem os cálculos. As etapas para construir um cladograma são mostradas na Figura 10.19.

- 1 Duas seqüências de rRNA são alinhadas e
- 2 a porcentagem de similaridade entre as seqüências é calculada.
- 3 A seguir, os ramos horizontais são desenhados em um comprimento proporcional à porcentagem de similaridade calculada. Todas as espécies além da ramificação (bifurcação) têm seqüências de rRNA similares, sugerindo que são provenientes de um ancestral posicionado nessa ramificação.



**Figura 10.18 FISH, ou hibridização fluorescente *in situ*.** Uma sonda de DNA ou RNA ligada a um corante fluorescente é utilizada para identificar cromossomos. As bactérias vistas com microscópio de contraste de fase **(a)** são identificadas por uma sonda marcada com fluorescência que hibridiza com uma sequência específica de DNA de *Staphylococcus aureus* **(b)**.

**P** O que é marcado utilizando a técnica de FISH?

**TESTE SEU CONHECIMENTO**

- ✓ O que é apresentado no *Bergey's Manual*? **10-13**
- ✓ Imagine um teste rápido para *Staphylococcus aureus* (dica: veja a Figura 6.10, página 169). **10-14**
- ✓ O que é testado no *Western blotting* e no *Southern blotting*? **10-15**
- ✓ O que é identificado por fagotipagem? **10-16**
- ✓ Como a PCR identifica um micro-organismo? **10-17**
- ✓ Quais técnicas envolvem a hibridização de ácidos nucleicos? **10-18**
- ✓ O cladograma é utilizado para identificação ou classificação? **10-12, 10-19**

**1** Determine a sequência de bases em uma molécula de rRNA para cada organismo. Somente uma sequência curta de bases é mostrada neste exemplo.

<i>Lactobacillus brevis</i>	AGUCCAGAGC
<i>L. sanfranciscensis</i>	GUAAAAGAGC
<i>L. acidophilus</i>	AGCGGAGAGC
<i>L. plantarum</i>	ACGUUAGAGC

**2** Calcule a porcentagem de similaridade nas bases nucleotídicas entre os pares de espécies. Por exemplo, existe uma similaridade de 70% entre as sequências de *L. brevis* e *L. acidophilus*.

Porcentagem de similaridade	
<i>L. brevis</i> → <i>L. sanfranciscensis</i>	50%
<i>L. brevis</i> → <i>L. acidophilus</i>	70%
<i>L. brevis</i> → <i>L. plantarum</i>	60%
<i>L. sanfranciscensis</i> → <i>L. acidophilus</i>	50%
<i>L. sanfranciscensis</i> → <i>L. plantarum</i>	50%
<i>L. plantarum</i> → <i>L. acidophilus</i>	60%

**3** Construa um cladograma. O comprimento das linhas horizontais corresponde aos valores de porcentagem de similaridade. Cada bifurcação ou ramificação no cladograma representa um ancestral comum a todas as espécies além da ramificação. Cada ramificação é definida por uma similaridade no rRNA presente em todas as espécies além desta bifurcação.

**Figura 10.19 Construindo um cladograma.**

**P** Por que *L. brevis* e *L. acidophilus* ramificam do mesmo ponto?