



SECRETARIA DO  
DESENVOLVIMENTO  
ECONÔMICO, CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA



## **Cartilha Informativa**

Diagnóstico e identificação de micro-organismos  
associados à infecção urinária por FT-IR e  
quimiometria

**Valeriano Antonio Corbellini**

Santa Cruz do Sul, janeiro de 2018

## Informações gerais

**Projeto:** Novas tecnologias em saúde para diagnóstico de infecções genitourinárias

**Convênio:** SCIT 68/2014

**Processo:** 220-2500/13-2

**Modalidade:** Participação Popular e Cidadã ([2012/2013])

**Nome do Polo:** Polo de Modernização Tecnológica do Vale do Rio Pardo

**Gestor(a):** Michele Braun

**COREDE:** Vale do Rio Pardo

**Área de Abrangência:** Saúde

**Coordenação:** Valeriano Antonio Corbellini

**Unidade Executora:** Universidade de Santa Cruz do Sul

## Etapa 1

## Coleta de amostras de urina

A coleta deve seguir as orientações do Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde (ANVISA, 2004)

Horário: primeira micção da manhã ou após retenção vesical de 2-3h.

Mulheres: afastar os grandes lábios da vagina e realizar higiene com gaze embebida em sabão neutro.  
Enxaguar com gaze umedecida (da frente para trás).  
Mantendo os grandes lábios afastados iniciar a micção, desprezando o jato inicial e coletando apenas o jato médio em frasco coletor estéril (disponibilizado pelo laboratório ou em farmácias)

Homens: expor a glândula após retração do prepúcio e realizar higiene com gaze embebida em sabão neutro.  
Enxaguar com gaze umedecida.  
Mantendo o prepúcio retraído, iniciar a micção, desprezando o jato inicial e coletando apenas o jato médio em frasco coletor estéril (disponibilizado pelo laboratório ou em farmácias).  
Preencher o frasco no máximo até a metade.

## Etapa 2

### Transporte e armazenagem de amostras de urina

Etiquetar o material de coleta com o nome do paciente, número de amostra, data e hora de coleta.

O transporte deve ser realizado em caixa térmica refrigerada (caixa de isopor com gelogel a 4°C).

A urina à temperatura ambiente deve ser analisada no máximo até uma hora após a coleta para urocultura e urianálise.  
Caso não possa ser analisada neste tempo a amostra deve ser armazenada por até 4 h sob refrigeração (4°C).  
Para análises de FT-IR a amostra pode ser acondicionada em microtubos e congelada a -20°C por tempo indeterminado.

## Etapa 3

## Urianálise

Esta etapa é necessária somente para o conjunto de amostras que irá servir para elaboração do conjunto de calibração e de validação cruzada.

Após homogeneização da amostra de urina procede-se às etapas de

- 1) Exame Qualitativo de Urina com fitas reagentes: entre os dez parâmetros avaliados o foco reside nos parâmetros nitrito e atividade e leucocitária.
- 2) Análise de sedimento após centrifugação.\*
- 3) Em caso positivo realizar urocultura inoculando alçada de 1  $\mu$ L em placa de 9 cm de diâmetro com tendo 10 mL de ágar CLED. Incubar a 37°C por 24 a 48h.\*

Realizar a contagem de Unidades Formadoras de Colônia.



Fonte: Autor

\* Alguns laboratórios realizam a coloração de Gram do esfregaço de urina como complemento.

## Etapa 4

## Análise por FT-IR: preparação de amostras de urina

**1º Passo:** Transferir 50 mL de urina\* para suporte de poliestireno coberto com lâmina de alumínio de área retangular de 3x10mm espalhando a amostra com a ponteira. Realizar esta etapa em simplicata.



Fonte: Autor

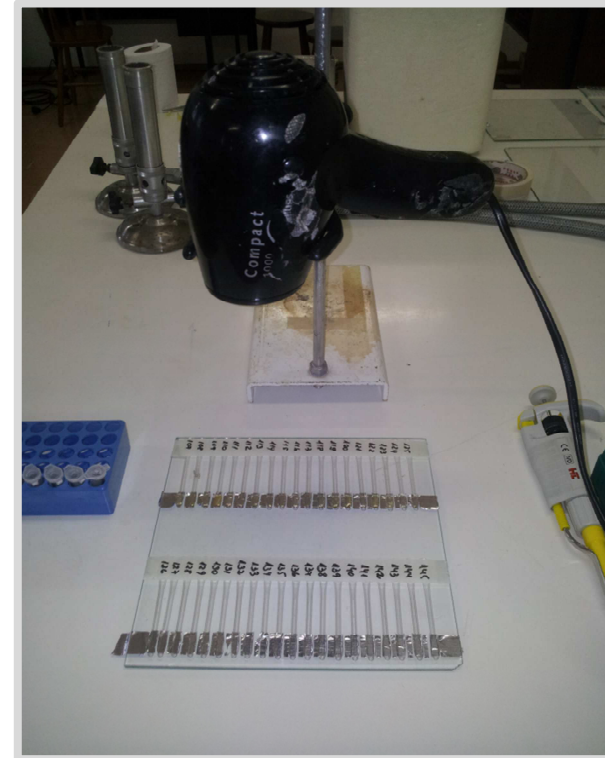
\* Alguns laboratórios realizam a coloração de Gram do esfregaço de urina como complemento.

## Etapa 4

## Análise por FT-IR: preparação de amostras de urina

**2º Passo:** Secar o suporte de cada amostra por 3-5 min sob corrente de ar (secador de cabelo) de modo a alcançar temperatura na faixa de 60-65°C.

Obs: Alternativamente o material pode ser desidratado em estufa bacteriológica a 37°C por 1h.



Fonte: Autor

\* Alguns laboratórios realizam a coloração de Gram do esfregaço de urina como complemento.

## Etapa 5

## Análise por FT-IR: aquisição dos espectros

**3º Passo:** Posicionar o suporte de cada amostra (uma amostra por vez) no acessório para Reflexão Total Atenuada (Perkin-Elmer) e adquirir o espectro da referida amostra em equipamento Spectrum 400 FTIR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer®) de 633nm, espectrômetro com laser de HeNe, com 8 pulsos de varredura na faixa de 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ , 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução, pressão “gauche” de 30, previamente calibrado com branco (*suporte* na mesma posição porém sem amostra de urina). Repetir mais duas leituras em posições diferentes ao longo da área de urina depositada de modo a obter triplicatas de leituras espectrais de cada amostra.



Fonte: Autor



## Etapa 6

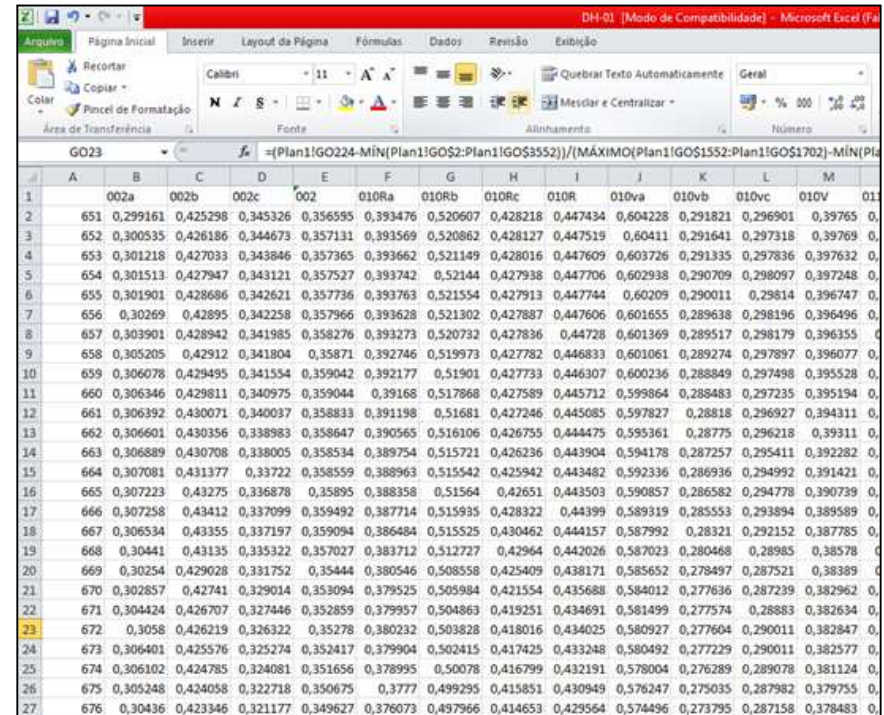
# Análise por FT-IR: elaboração da planilha de espectros

**1º Passo:** Salvar os espectros adquiridos no formato \*.spa conforme rotina do software SPECTRUM 10™ (Perkin-Elmer).

**2º Passo:** Abrir os espectros em extensão \*.spa em software OMNIC™ (Termo Fischer Scientific) e salvá-los em extensão “\*.csv (separado por vírgulas)”

**3º Passo:** Abrir o arquivo em extensão \*.csv da primeira replicata da primeira amostra e salvar como novo arquivo Excel como o nome de “Dados01”. Trocar o nome da planilha no rodapé desta planilha Excel para Plan1.

**4º Passo:** Abrir os arquivos das demais replicatas da primeira amostra, copiar apenas a segunda coluna (coluna B) de cada arquivo e colá-los em sequência ao lado da coluna B de Plan1.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		002a	002b	002c	002	010Ra	010Rb	010Rc	010R	010va	010vb	010vc	010V	010
2	651	0,299161	0,425298	0,345326	0,356595	0,393476	0,520607	0,428218	0,447434	0,604228	0,291821	0,296901	0,39765	0,
3	652	0,300535	0,426186	0,344673	0,357131	0,393569	0,520862	0,428127	0,447519	0,60411	0,291641	0,297318	0,39769	0,
4	653	0,301218	0,427033	0,343846	0,357365	0,393662	0,521149	0,428016	0,447609	0,603726	0,291335	0,297836	0,397632	0,
5	654	0,301513	0,427947	0,343121	0,357527	0,393742	0,52144	0,427938	0,447706	0,602938	0,290709	0,298097	0,397248	0,
6	655	0,301901	0,428686	0,342621	0,357736	0,393763	0,521554	0,427913	0,447744	0,60209	0,290011	0,29814	0,396747	0,
7	656	0,30269	0,42895	0,342258	0,357966	0,393628	0,521302	0,427887	0,447606	0,601655	0,289638	0,298196	0,396496	0,
8	657	0,303901	0,428942	0,341985	0,358276	0,393273	0,520732	0,427836	0,44728	0,601369	0,289517	0,298179	0,396355	0,
9	658	0,305205	0,42912	0,341804	0,35871	0,392746	0,519973	0,427782	0,446833	0,601061	0,289274	0,297897	0,396077	0,
10	659	0,306078	0,429495	0,341554	0,359042	0,392177	0,51901	0,427733	0,446307	0,600236	0,288849	0,297498	0,395528	0,
11	660	0,306346	0,429811	0,340975	0,359044	0,39168	0,517868	0,427589	0,445712	0,599864	0,288483	0,297235	0,395194	0,
12	661	0,306392	0,430071	0,340037	0,358833	0,391198	0,51681	0,427246	0,445085	0,597827	0,28818	0,296927	0,394311	0,
13	662	0,306601	0,430356	0,338983	0,358647	0,390565	0,516106	0,426755	0,444475	0,595361	0,28775	0,296218	0,39311	0,
14	663	0,306889	0,430708	0,338005	0,358534	0,389754	0,515721	0,426236	0,443904	0,594178	0,287257	0,295411	0,392282	0,
15	664	0,307081	0,431377	0,33722	0,358559	0,388963	0,515542	0,425942	0,443482	0,592336	0,286936	0,294992	0,391421	0,
16	665	0,307223	0,43275	0,336878	0,35895	0,388358	0,51564	0,42651	0,443503	0,590857	0,286582	0,294778	0,390739	0,
17	666	0,307258	0,43412	0,337099	0,359492	0,387714	0,515935	0,428322	0,44399	0,589319	0,285553	0,293894	0,389589	0,
18	667	0,306534	0,43355	0,337197	0,359094	0,386484	0,515525	0,430462	0,444157	0,587992	0,28321	0,292152	0,387785	0,
19	668	0,30441	0,43135	0,335322	0,357027	0,383712	0,512727	0,42964	0,442026	0,587023	0,280468	0,28985	0,38578	0,
20	669	0,30254	0,429028	0,331752	0,35444	0,380546	0,508558	0,425409	0,438171	0,585652	0,278497	0,287521	0,38389	0,
21	670	0,302857	0,42741	0,329014	0,353094	0,379525	0,505984	0,421554	0,435688	0,584012	0,277636	0,287239	0,382962	0,
22	671	0,304424	0,426707	0,327446	0,352859	0,379957	0,504863	0,419251	0,434691	0,581499	0,277574	0,28883	0,382634	0,
23	672	0,3058	0,426219	0,326322	0,35278	0,380232	0,503828	0,418016	0,434025	0,580927	0,277604	0,290011	0,382847	0,
24	673	0,306401	0,425576	0,325274	0,352417	0,379904	0,502415	0,417425	0,433248	0,580492	0,277229	0,290011	0,382577	0,
25	674	0,306102	0,424785	0,324081	0,351656	0,378995	0,50078	0,416799	0,432191	0,578004	0,276289	0,289078	0,381124	0,
26	675	0,305248	0,424058	0,322718	0,350675	0,3777	0,499295	0,415851	0,430949	0,576247	0,275035	0,287982	0,379755	0,
27	676	0,30436	0,423346	0,321177	0,349627	0,376073	0,497966	0,414653	0,429564	0,574496	0,273795	0,287158	0,378483	0,

Fonte: Autor

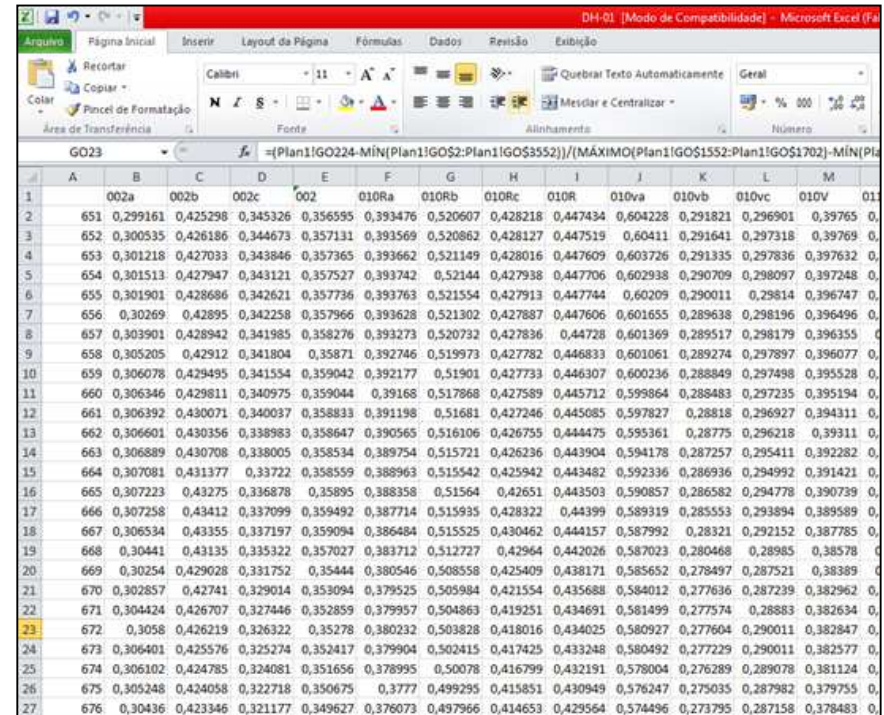
## Etapa 6

# Análise por FT-IR: elaboração da planilha de espectros

**5º Passo:** Marcar as células B2 a D2 de Plan1 e inserir células deslocando as demais para baixo.

**6º Passo:** Identificar os nomes das replicatas de espectro de cada amostra nas respectivas células inseridas. Ex: Para uma amostra denominada 001, as células das triplicatas ficarão identificadas como “001a, 001b e 001c”.

**7º Passo:** Deixar uma coluna em branco após a inserção dos dados de absorbância do conjunto de replicatas da primeira amostra em Plan1. E nomeá-la com o mesmo prefixo da amostra, porém com ou sem o sufixo “m”. Ex: Para a amostra A001 a coluna E receberá a identificação de “A001m”.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	O1
1		002a	002b	002c	002	010Ra	010Rb	010Rc	010R	010va	010vb	010vc	010V	010V
2	651	0,299161	0,425298	0,345326	0,356595	0,393476	0,520607	0,428218	0,447434	0,604228	0,291821	0,296901	0,39765	0,39765
3	652	0,300535	0,426186	0,344673	0,357131	0,393569	0,520862	0,428127	0,447519	0,60411	0,291641	0,297318	0,39769	0,39769
4	653	0,301218	0,427033	0,343846	0,357365	0,393662	0,521149	0,428016	0,447609	0,603726	0,291335	0,297836	0,397632	0,397632
5	654	0,301513	0,427947	0,343121	0,357527	0,393742	0,52144	0,427938	0,447706	0,602938	0,290709	0,298097	0,397248	0,397248
6	655	0,301901	0,428686	0,342621	0,357736	0,393763	0,521554	0,427913	0,447744	0,60209	0,290011	0,29814	0,396747	0,396747
7	656	0,30269	0,42895	0,342258	0,357966	0,393628	0,521302	0,427887	0,447606	0,601655	0,289638	0,298196	0,396496	0,396496
8	657	0,303901	0,428942	0,341985	0,358276	0,393273	0,520732	0,427836	0,44728	0,601369	0,289517	0,298179	0,396355	0,396355
9	658	0,305205	0,42912	0,341804	0,35871	0,392746	0,519973	0,427782	0,446833	0,601061	0,289274	0,297897	0,396077	0,396077
10	659	0,306078	0,429495	0,341554	0,359042	0,392177	0,51901	0,427733	0,446307	0,600236	0,288849	0,297498	0,395528	0,395528
11	660	0,306346	0,429811	0,340975	0,359044	0,39168	0,517868	0,427589	0,445712	0,599864	0,288483	0,297235	0,395194	0,395194
12	661	0,306392	0,430071	0,340037	0,358833	0,391198	0,51681	0,427246	0,445085	0,597827	0,28818	0,296927	0,394311	0,394311
13	662	0,306601	0,430356	0,338983	0,358647	0,390565	0,516106	0,426755	0,444475	0,595361	0,28775	0,296218	0,393911	0,393911
14	663	0,306889	0,430708	0,338005	0,358534	0,389754	0,515721	0,426236	0,443904	0,594178	0,287257	0,295411	0,392282	0,392282
15	664	0,307081	0,431377	0,33722	0,358559	0,388963	0,515542	0,425942	0,443482	0,592336	0,286936	0,294992	0,391421	0,391421
16	665	0,307223	0,43275	0,336878	0,35895	0,388358	0,51564	0,42651	0,443503	0,590857	0,286582	0,294778	0,390739	0,390739
17	666	0,307258	0,43412	0,337099	0,359492	0,387714	0,515935	0,428322	0,44399	0,589319	0,285553	0,293894	0,389589	0,389589
18	667	0,306534	0,43355	0,337197	0,359094	0,386484	0,515525	0,430462	0,444157	0,587992	0,28321	0,292152	0,387785	0,387785
19	668	0,30441	0,43135	0,335322	0,357027	0,383712	0,512727	0,42964	0,442026	0,587023	0,280468	0,28985	0,38578	0,38578
20	669	0,30254	0,429028	0,331752	0,35444	0,380546	0,508558	0,425409	0,438171	0,585652	0,278497	0,287521	0,38389	0,38389
21	670	0,302857	0,42741	0,329014	0,353094	0,379525	0,505984	0,421554	0,435688	0,584012	0,277636	0,287239	0,382962	0,382962
22	671	0,304424	0,426707	0,327446	0,352859	0,379957	0,504863	0,419251	0,434691	0,581499	0,277574	0,28883	0,382634	0,382634
23	672	0,3058	0,426219	0,326322	0,35278	0,380232	0,503828	0,418016	0,434025	0,580927	0,277604	0,290011	0,382847	0,382847
24	673	0,306401	0,425576	0,325274	0,352417	0,379904	0,502415	0,417425	0,433248	0,580492	0,277229	0,290011	0,382577	0,382577
25	674	0,306102	0,424785	0,324081	0,351656	0,378995	0,50078	0,416799	0,432191	0,578004	0,276289	0,289078	0,381124	0,381124
26	675	0,305248	0,424058	0,322718	0,350675	0,3777	0,499295	0,415851	0,430949	0,576247	0,275035	0,287982	0,379755	0,379755
27	676	0,30436	0,423346	0,321177	0,349627	0,376073	0,497966	0,414653	0,429564	0,574496	0,273795	0,287158	0,378483	0,378483

Fonte: Autor

## Etapa 6

# Análise por FT-IR: elaboração da planilha de espectros

**8º Passo:** Inserir os dados das demais amostras repetindo os passos 8 a 11 até completar a elaboração da tabela com todos os espectros.

**9º Passo:** Abrir nova planilha (Plan2) no mesmo arquivo Excel de Plan1 e na célula A1 aplicar a fórmula:

=Plan1!A1

e estender a fórmula de A1 até A3352.

**10º Passo:** Estender a fórmula de A1 até B1. Na célula de B1 em Plan2 deverá aparecer a fórmula:

=Plan1!B2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	O1
1		002a	002b	002c	002	010Ra	010Rb	010Rc	010R	010va	010vb	010vc	010V	01
2	651	0,299161	0,425298	0,345326	0,356595	0,393476	0,520607	0,428218	0,447434	0,604228	0,291821	0,296901	0,39765	0,
3	652	0,300535	0,426186	0,344673	0,357131	0,393569	0,520862	0,428127	0,447519	0,60411	0,291641	0,297318	0,39769	0,
4	653	0,301218	0,427033	0,343846	0,357365	0,393662	0,521149	0,428016	0,447609	0,603726	0,291335	0,297836	0,397632	0,
5	654	0,301513	0,427947	0,343121	0,357527	0,393742	0,52144	0,427938	0,447706	0,602938	0,290709	0,298097	0,397248	0,
6	655	0,301901	0,428686	0,342621	0,357736	0,393763	0,521554	0,427913	0,447744	0,60209	0,290011	0,29814	0,396747	0,
7	656	0,30269	0,42895	0,342258	0,357966	0,393628	0,521302	0,427887	0,447606	0,601655	0,289638	0,298196	0,396496	0,
8	657	0,303901	0,428942	0,341985	0,358276	0,393273	0,520732	0,427836	0,44728	0,601369	0,289517	0,298179	0,396355	0,
9	658	0,305205	0,42912	0,341804	0,35871	0,392746	0,519973	0,427782	0,446833	0,601061	0,289274	0,297897	0,396077	0,
10	659	0,306078	0,429495	0,341554	0,359042	0,392177	0,51901	0,427733	0,446307	0,600236	0,288849	0,297498	0,395528	0,
11	660	0,306346	0,429811	0,340975	0,359044	0,39168	0,517868	0,427589	0,445712	0,599864	0,288483	0,297235	0,395194	0,
12	661	0,306392	0,430071	0,340037	0,358833	0,391198	0,51681	0,427246	0,445085	0,597827	0,28818	0,296927	0,394311	0,
13	662	0,306601	0,430356	0,338983	0,358647	0,390565	0,516106	0,426755	0,444475	0,595361	0,28775	0,296218	0,39311	0,
14	663	0,306889	0,430708	0,338005	0,358534	0,389754	0,515721	0,426236	0,443904	0,594178	0,287257	0,295411	0,392282	0,
15	664	0,307081	0,431377	0,33722	0,358559	0,388963	0,515542	0,425942	0,443482	0,592336	0,286936	0,294992	0,391421	0,
16	665	0,307223	0,43275	0,336878	0,35895	0,388358	0,51564	0,42651	0,443503	0,590857	0,286582	0,294778	0,390739	0,
17	666	0,307258	0,43412	0,337099	0,359492	0,387714	0,515935	0,428322	0,44399	0,589319	0,285553	0,293894	0,389589	0,
18	667	0,306534	0,43355	0,337197	0,359094	0,386484	0,515525	0,430462	0,444157	0,587992	0,28321	0,292152	0,387785	0,
19	668	0,30441	0,43135	0,335322	0,357027	0,383712	0,512727	0,42964	0,442026	0,587023	0,280468	0,28985	0,38578	0,
20	669	0,30254	0,429028	0,331752	0,35444	0,380546	0,508558	0,425409	0,438171	0,585652	0,278497	0,287521	0,38389	0,
21	670	0,302857	0,42741	0,329014	0,353094	0,379525	0,505984	0,421554	0,435688	0,584012	0,277636	0,287239	0,382962	0,
22	671	0,304424	0,426707	0,327446	0,352859	0,379957	0,504863	0,419251	0,434691	0,581499	0,277574	0,28883	0,382634	0,
23	672	0,3058	0,426219	0,326322	0,35278	0,380232	0,503828	0,418016	0,434025	0,580927	0,277604	0,290011	0,382847	0,
24	673	0,306401	0,425576	0,325274	0,352417	0,379904	0,502415	0,417425	0,433248	0,580492	0,277229	0,290011	0,382577	0,
25	674	0,306102	0,424785	0,324081	0,351656	0,378995	0,50078	0,416799	0,432191	0,578004	0,276289	0,289078	0,381124	0,
26	675	0,305248	0,424058	0,322718	0,350675	0,3777	0,499295	0,415851	0,430949	0,576247	0,275035	0,287982	0,379755	0,
27	676	0,30436	0,423346	0,321177	0,349627	0,376073	0,497966	0,414653	0,429564	0,574496	0,273795	0,287158	0,378483	0,

Fonte: Autor



## Etapa 6

# Análise por FT-IR: elaboração da planilha de espectros

**11º passo:** Em B2 aplicar a normalização pela amplitude para a respectiva coluna de Plan1 conforme a fórmula:

$$=(\text{Plan1!B1}-\text{MÍNIMO}(\text{Plan1!B\$2:Plan1!B\$3552})) / (\text{MÁXIMO}(\text{Plan1!B\$2:Plan1!B\$3552}) - \text{MÍNIMO}(\text{Plan1!B\$2:Plan1!B\$3552}))$$

**12º passo:** Verificar a última coluna preenchida em Plan1, retornar para Plan2 e realizar a normalização das demais amostras marcando a coluna B2 em Plan2 e estendendo-a até a última coluna respectiva preenchida em Plan1.

Neste passo deverão aparecer colunas cujo menor valor é zero e o maior valor é 1 e, na primeira cela, a respectiva identificação encontrada em Plan1. Após cada conjunto de triplicatas aparecerá um coluna preenchida com "#####".

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	O1
1		002a	002b	002c	002e	010Ra	010Rb	010Rc	010R	010va	010vb	010vc	010V	010V
2	651	0,299161	0,425298	0,345326	0,356595	0,393476	0,520607	0,428218	0,447434	0,604228	0,291821	0,296901	0,39765	0,39765
3	652	0,300535	0,426186	0,344673	0,357131	0,393569	0,520862	0,428127	0,447519	0,60411	0,291641	0,297318	0,39769	0,39769
4	653	0,301218	0,427033	0,343846	0,357365	0,393662	0,521149	0,428016	0,447609	0,603726	0,291335	0,297836	0,397632	0,397632
5	654	0,301513	0,427947	0,343121	0,357527	0,393742	0,52144	0,427938	0,447706	0,602938	0,290709	0,298097	0,397248	0,397248
6	655	0,301901	0,428686	0,342621	0,357736	0,393763	0,521554	0,427913	0,447744	0,60209	0,290011	0,29814	0,396747	0,396747
7	656	0,30269	0,42895	0,342258	0,357966	0,393628	0,521302	0,427887	0,447606	0,601655	0,289638	0,298196	0,396496	0,396496
8	657	0,303901	0,428942	0,341985	0,358276	0,393273	0,520732	0,427836	0,44728	0,601369	0,289517	0,298179	0,396355	0,396355
9	658	0,305205	0,42912	0,341804	0,35871	0,392746	0,519973	0,427782	0,446833	0,601061	0,289274	0,297897	0,396077	0,396077
10	659	0,306078	0,429495	0,341554	0,359042	0,392177	0,51901	0,427733	0,446307	0,600236	0,288849	0,297498	0,395528	0,395528
11	660	0,306346	0,429811	0,340975	0,359044	0,39168	0,517868	0,427589	0,445712	0,599864	0,288483	0,297235	0,395194	0,395194
12	661	0,306392	0,430071	0,340037	0,358833	0,391198	0,51681	0,427246	0,445085	0,597827	0,28818	0,296927	0,394311	0,394311
13	662	0,306601	0,430356	0,338983	0,358647	0,390565	0,516106	0,426755	0,444475	0,595361	0,28775	0,296218	0,393911	0,393911
14	663	0,306889	0,430708	0,338005	0,358534	0,389754	0,515721	0,426236	0,443904	0,594178	0,287257	0,295411	0,392282	0,392282
15	664	0,307081	0,431377	0,33722	0,358559	0,388963	0,515542	0,425942	0,443482	0,592336	0,286936	0,294992	0,391421	0,391421
16	665	0,307223	0,43275	0,336878	0,35895	0,388358	0,51564	0,42651	0,443503	0,590857	0,286582	0,294778	0,390739	0,390739
17	666	0,307258	0,43412	0,337099	0,359492	0,387714	0,515935	0,428322	0,44399	0,589319	0,285553	0,293894	0,389589	0,389589
18	667	0,306534	0,43355	0,337197	0,359094	0,386484	0,515525	0,430462	0,444157	0,587992	0,28321	0,292152	0,387785	0,387785
19	668	0,30441	0,43135	0,335322	0,357027	0,383712	0,512727	0,42964	0,442026	0,587023	0,280468	0,28985	0,38578	0,38578
20	669	0,30254	0,429028	0,331752	0,35444	0,380546	0,508558	0,425409	0,438171	0,585652	0,278497	0,287521	0,38389	0,38389
21	670	0,302857	0,42741	0,329014	0,353094	0,379525	0,505984	0,421554	0,435688	0,584012	0,277636	0,287239	0,382962	0,382962
22	671	0,304424	0,426707	0,327446	0,352859	0,379957	0,504863	0,419251	0,434691	0,581499	0,277574	0,28883	0,382634	0,382634
23	672	0,3058	0,426219	0,326322	0,35278	0,380232	0,503828	0,418016	0,434025	0,580927	0,277604	0,290011	0,382847	0,382847
24	673	0,306401	0,425576	0,325274	0,352417	0,379904	0,502415	0,417425	0,433248	0,580492	0,277229	0,290011	0,382577	0,382577
25	674	0,306102	0,424785	0,324081	0,351656	0,378995	0,50078	0,416799	0,432191	0,578004	0,276289	0,289078	0,381124	0,381124
26	675	0,305248	0,424058	0,322718	0,350675	0,3777	0,499295	0,415851	0,430949	0,576247	0,275035	0,287982	0,379755	0,379755
27	676	0,30436	0,423346	0,321177	0,349627	0,376073	0,497966	0,414653	0,429564	0,574496	0,273795	0,287158	0,378483	0,378483

Fonte: Autor

## Etapa 6

# Análise por FT-IR: elaboração da planilha de espectros

**13º passo:** Marcar a cela E2 em Plan2 (primeira coluna preenchida com “#####”) e inserir a fórmula:

= MÉDIA(B2:D2)

e estender a fórmula de E1 até E3552.

**14º passo:** Com a coluna E2 ainda marcada, copiá-la e colá-la nas demais colunas preenchidas com “#####” até a última amostra.

**15º passo:** Inserir um dado de variável independente ( $ITU+=1/ITU=0$ ). sempre na célula da primeira linha abaixo do último valor inserido da primeira replicata de cada amostra. Estender este dado para as demais replicatas e para a média. Repetir este procedimento para cada variável independente.

**16º Passo:** Deslocar Plan2 para frente de Plan1 e salvar.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		002a	002b	002c	002	010Ra	010Rb	010Rc	010R	010va	010vb	010vc	010V	010V
2	651	0,299161	0,425298	0,345326	0,356595	0,393476	0,520607	0,428218	0,447434	0,604228	0,291821	0,296901	0,39765	0,39765
3	652	0,300535	0,426186	0,344673	0,357131	0,393569	0,520862	0,428127	0,447519	0,60411	0,291641	0,297318	0,39769	0,39769
4	653	0,301218	0,427033	0,343846	0,357365	0,393662	0,521149	0,428016	0,447609	0,603726	0,291335	0,297836	0,397632	0,397632
5	654	0,301513	0,427947	0,343121	0,357527	0,393742	0,52144	0,427938	0,447706	0,602938	0,290709	0,298097	0,397248	0,397248
6	655	0,301901	0,428686	0,342621	0,357736	0,393763	0,521554	0,427913	0,447744	0,60209	0,290011	0,29814	0,396747	0,396747
7	656	0,30269	0,42895	0,342258	0,357966	0,393628	0,521302	0,427887	0,447606	0,601655	0,289638	0,298196	0,396496	0,396496
8	657	0,303901	0,428942	0,341985	0,358276	0,393273	0,520732	0,427836	0,44728	0,601369	0,289517	0,298179	0,396355	0,396355
9	658	0,305205	0,42912	0,341804	0,35871	0,392746	0,519973	0,427782	0,446833	0,601061	0,289274	0,297897	0,396077	0,396077
10	659	0,306078	0,429495	0,341554	0,359042	0,392177	0,51901	0,427733	0,446307	0,600236	0,288849	0,297498	0,395528	0,395528
11	660	0,306346	0,429811	0,340975	0,359044	0,39168	0,517868	0,427589	0,445712	0,599864	0,288483	0,297235	0,395194	0,395194
12	661	0,306392	0,430071	0,340037	0,358833	0,391198	0,51681	0,427246	0,445085	0,597827	0,28818	0,296927	0,394311	0,394311
13	662	0,306601	0,430356	0,338983	0,358647	0,390565	0,516106	0,426755	0,444475	0,595361	0,28775	0,296218	0,393911	0,393911
14	663	0,306889	0,430708	0,338005	0,358534	0,389754	0,515721	0,426236	0,443904	0,594178	0,287257	0,295411	0,392282	0,392282
15	664	0,307081	0,431377	0,33722	0,358559	0,388963	0,515542	0,425942	0,443482	0,592336	0,286936	0,294992	0,391421	0,391421
16	665	0,307223	0,43275	0,336878	0,35895	0,388358	0,51564	0,42651	0,443503	0,590857	0,286582	0,294778	0,390739	0,390739
17	666	0,307258	0,43412	0,337099	0,359492	0,387714	0,515935	0,428322	0,44399	0,589319	0,285553	0,293894	0,389589	0,389589
18	667	0,306534	0,43355	0,337197	0,359094	0,386484	0,515525	0,430462	0,444157	0,587992	0,28321	0,292152	0,387785	0,387785
19	668	0,30441	0,43135	0,335322	0,357027	0,383712	0,512727	0,42964	0,442026	0,587023	0,280468	0,28985	0,38578	0,38578
20	669	0,30254	0,429028	0,331752	0,35444	0,380546	0,508558	0,425409	0,438171	0,585652	0,278497	0,287521	0,38389	0,38389
21	670	0,302857	0,42741	0,329014	0,353094	0,379525	0,505984	0,421554	0,435688	0,584012	0,277636	0,287239	0,382962	0,382962
22	671	0,304424	0,426707	0,327446	0,352859	0,379957	0,504863	0,419251	0,434691	0,581499	0,277574	0,28883	0,382634	0,382634
23	672	0,3058	0,426219	0,326322	0,35278	0,380232	0,503828	0,418016	0,434025	0,580927	0,277604	0,290011	0,382847	0,382847
24	673	0,306401	0,425576	0,325274	0,352417	0,379904	0,502415	0,417425	0,433248	0,580492	0,277229	0,290011	0,382577	0,382577
25	674	0,306102	0,424785	0,324081	0,351656	0,378995	0,50078	0,416799	0,432191	0,578004	0,276289	0,289078	0,381124	0,381124
26	675	0,305248	0,424058	0,322718	0,350675	0,3777	0,499295	0,415851	0,430949	0,576247	0,275035	0,287982	0,379755	0,379755
27	676	0,30436	0,423346	0,321177	0,349627	0,376073	0,497966	0,414653	0,429564	0,574496	0,273795	0,287158	0,378483	0,378483

Fonte: Autor

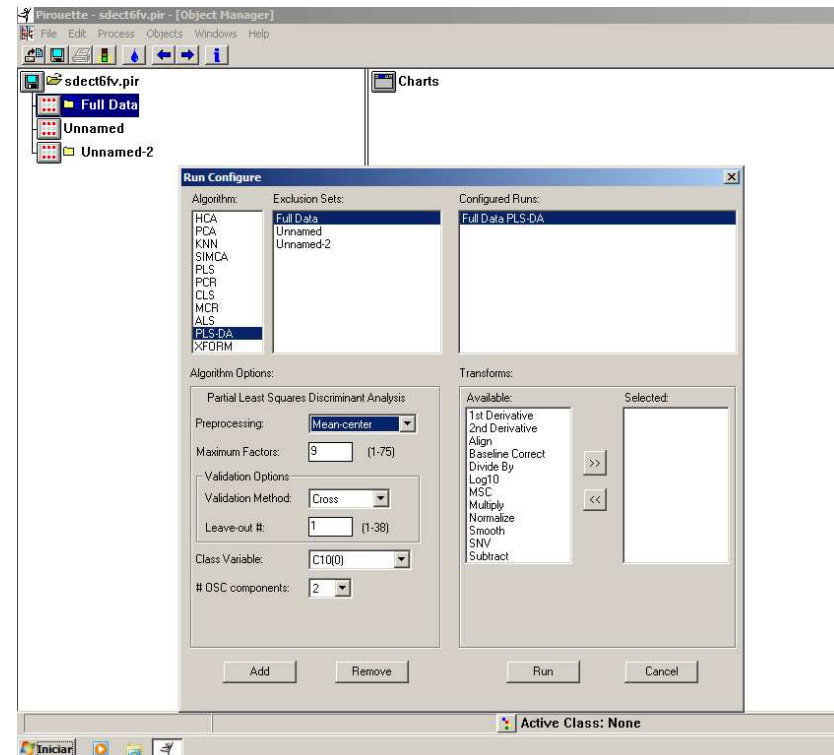
## Etapa 7

# Elaboração do método quimiométrico de diagnóstico de ITU

**1º passo:** Abrir o arquivo em extensão \*.xls "Dados01" em software Pirouette 4.0 : e transferir os dados para o software Pirouette versão 4.0 ou outro software equivalente de análise multivariada.

**2º passo:** Realizar as operações de definição de

- transposição da planilha de dados
- exclusão de colunas de replicatas e manutenção das colunas de médias.
- definição da coluna de classe. No nosso caso amostras ITU+ (valor 1) e ITU-(valor 0);
- aplicação do algoritmo PLS-DA com diferentes combinações de pré-processamento de variável e de amostra e de correção de sinal ortogonal (2 componentes).



Fonte: Autor

## Etapa 7

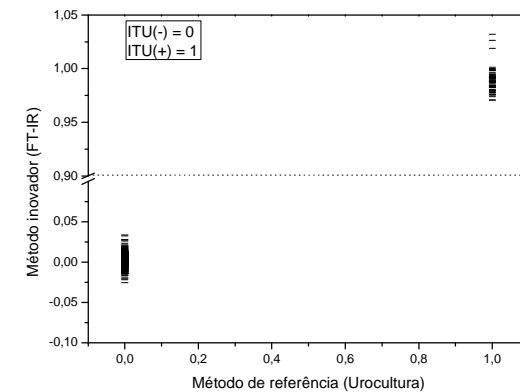
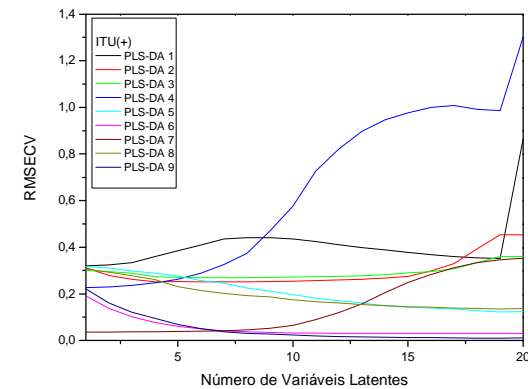
# Elaboração do método quimiométrico de diagnóstico de ITU

**3º Passo:** Selecionar o modelo com menor erro de previsão (RMSECV) e valor de  $R^2$  mais próximo de 1,0 (considerar seis casas decimais) e número mínimo de fatores (VL) necessários dado por:

$$VL = (A-6)/6$$

Onde A é o número de espectros disponíveis incluídos para modelagem.

**4º Passo:** Salvar modelo: “File → Save Models → Yi Médias → PLS-DA”.



Fonte: Autor

# Vantagens dos novos métodos em relação às metodologias tradicionais

## Métodos tradicionais

### Diagnóstico de ITU:

- Necessita de consumo de reagentes para realização de Exame Qualitativo de Urina (QUE) e de meios de cultivo (CLED) para realização de urocultura.

### Identificação de agente de ITU:

- Necessita de consumo de meios seletivos e diferenciais para identificação de propriedades fisiológicas dos micro-organismos que possam ser relacionadas a gêneros e espécies. No caso foi usado como critério de identificação a diferenciação entre agentes de ITU Lac+ e Lac- usando o meio CLED.

## Métodos inovadores

- Os métodos baseados em FT-IR (técnica de ATR) não necessitam de reagentes nem para urianálise (EQU) ou urocultura.
- Não necessitam incubação em meios de cultivo para identificação de agentes de ITU Lac+ ou Lac-.
- Não agredem o meio-ambiente por gerarem baixa quantidades de resíduos tóxicos (palhetas de poliestireno com papel alumínio).
- Agilizam as análises microbiológicas de urina.

LOPES HV, TAVARES W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 51(6):306-308, 2005.

QUEIROZ MGR, ALENCAR NMN, MELO CL. Proposta de um modelo de padronização para o exame sumário de urina. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 32(4):243-247, 2000.

SCARPARO C, PICCOLLI P, RICORDI P, SCAGNELLI M. Comparative evaluation of two commercial chromogenic media for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 21(4): 283-289, 2002



## Limitações do novo método

Os modelos PLS-DA só apresentam predição de boa qualidade desde que as amostras de urina apresentem características semelhantes às do conjunto de validação cruzada.

A implementação e aplicação de modelos quimiométricos requer pessoal capacitado em recursos de Análise Multivariada o que não faz parte da rotina de cursos de graduação em Farmácia, Biomedicina e de Ciências Biológicas.



Fonte: Autor