



SECRETARIA DO
DESENVOLVIMENTO
ECONÔMICO, CIÊNCIA
E TECNOLOGIA



Cartilha Informativa

Diagnóstico e identificação de micro-organismos
associados à infecção urinária/vaginal por ensaio
fluorogênico

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

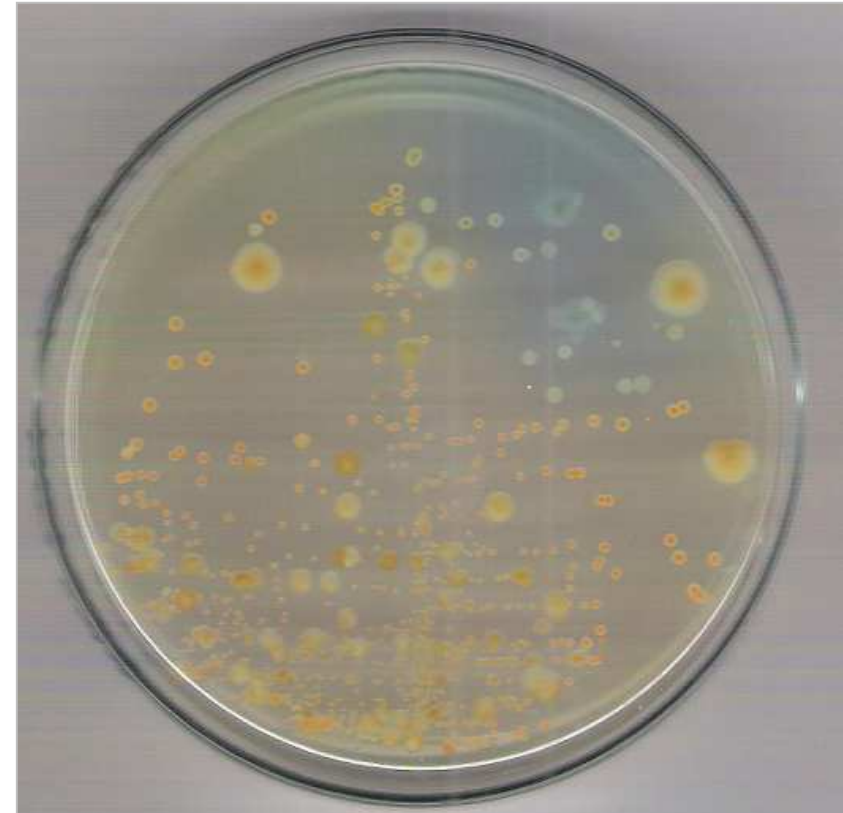
Coordenação: Valeriano Antonio Corbellini

Unidade Executora: Universidade de Santa Cruz do Sul

Etapa 1

Coleta de amostras e isolamento primário

Amostras de urina ou de fluido vaginal e são inoculadas em meios de isolamento primário específico conforme normas estabelecidas nas diretrizes do Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde (ANVISA, 2004) ou conforme rotinas estabelecidas em cada laboratório de Análises Clínicas.



Fonte: Autor

Etapa 2

Preparo de inóculo

Após a confirmação do isolamento primário (coloração de Gram) prepara-se uma suspensão da cultura em caldo peptonado estéril a 1%.*



Fonte: Autor

* Evitar o uso de suspensão em água destilada.

Etapa 3

Inoculação

Alíquota de 5-10 μL de suspensão de cultura microbiana* é inoculada em ágar CLED ou NGA** (glicose 10 g.L^{-1} , peptona 10 g.L^{-1} ; água 1 L) acrescido de 1% de solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de Substrato Fluorogênico (SF) em dimetilsulfóxido.***



Fonte: Autor

* Alternativamente pode ser usada alçada de cultura direto do isolamento primário. A suspensão produz espalhamento mais uniforme sobre a superfície do ágar.

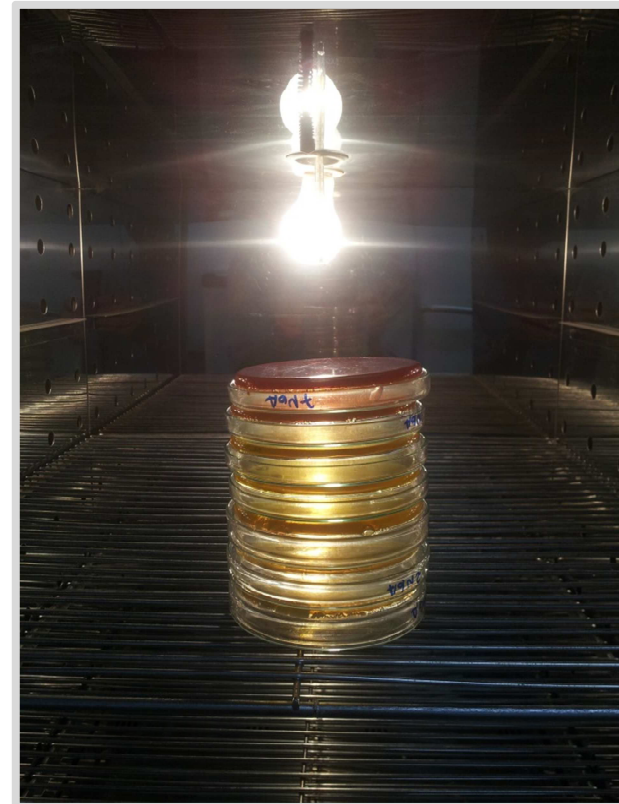
** Outros meios sólidos de interesse podem ser usados mas é necessária nova padronização do método com culturas padrões e com SF específico.

*** O uso de solvente não é obrigatório. Mas é necessário que haja solubilização do SF no meio.

Etapa 4

Incubação

Em seguida as placas são incubadas invertidas em estufa a 37°C por 24-48h.



Fonte: Autor

Etapa 5

Revelação do ensaio com substrato fluorogênico

Posicionar a placa em câmara de luz uv de 360nm e analisar a emissão de fluorescência. Comparar com padrões de emissão de culturas padrões de Infecção urinária ou de infecção vaginal previamente inoculadas nas mesmas condições.

Critérios para identificação de um micro-organismo específico:

- a) A cultura apresenta uma cor de fluorescência diferente das demais.
- b) A cultura não apresenta fluorescência enquanto que as demais apresentam.



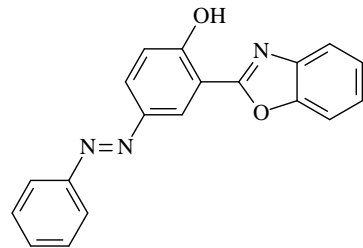
Fonte: Autor

Aplicação prática

Identificação de micro-organismos de infecção urinária

Ágar: NGA;

Substrato fluorogênico: 2-(5-fenilazo-2'-hidroxi)fenilbenzoxazol



Cepas:

A – *Acetobacter baumannii* ATCC19606

B - *Enterococcus faecalis* ATCC2912

C – *Escherichia coli* ATCC25922

D – *Klebsiella pneumonia* ATCC13883

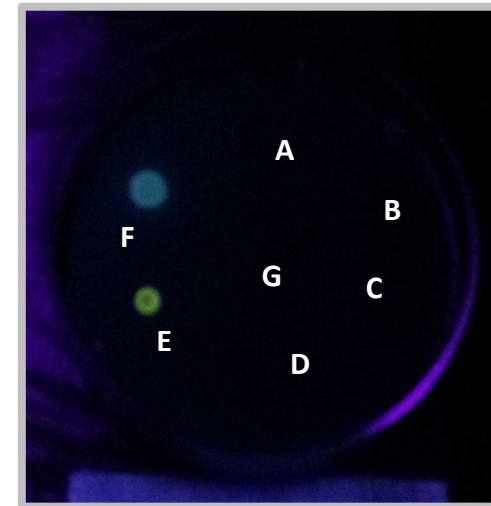
E – *Proteus sp.* (isolado clínico)

F – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

G – *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Resultado:

Identifica *Proteus* com cor amarela e *Pseudomonas aeruginosa* com cor azul. As demais culturas não crescem.



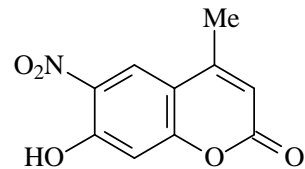
Fonte: Autor

Aplicação prática

Identificação de micro-organismos de infecção vaginal

Ágar: NGA;

Substrato fluorogênico: 4-hidroxi-6-nitro-4-metil-cumarina.



Cepas:

A – *C. albicans* ATCC10231

B – *C. albicans* 0051L

C – *C. famata* RL 28

D – *C. glabrata* RL49

E – *C. glabrata* 993

F – *C. glabrata* 0013-L

G – *C. glabrata* 0030-L

H – *C. guilhiermondii* TA07

I – *C. krusei* ATCC6258

J – *C. krusei* 0037-L

K – *C. lusitanae* RL21

L – *C. parapsilosis* ATCC22019 (sem crescimento)

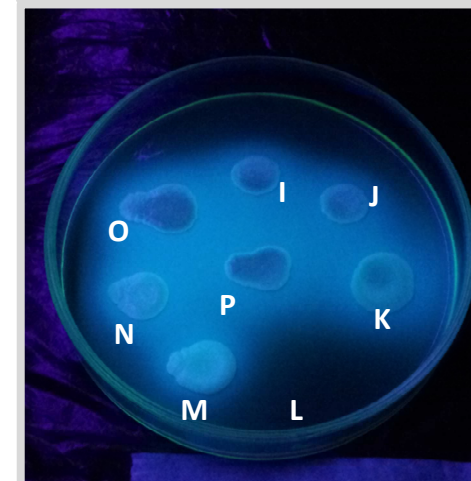
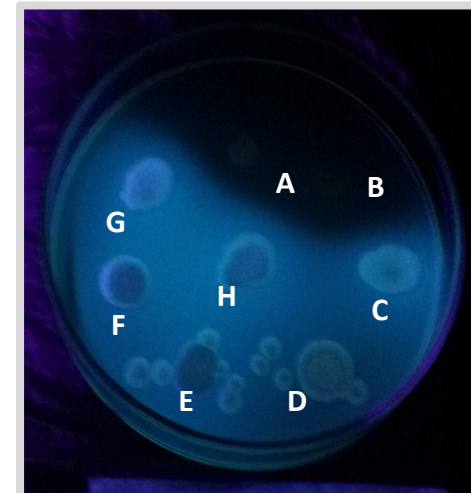
M – *C. parapsilosis* RL33

N – *C. parapsilosis* RL38

O – *C. stellacoides* 987

P – *C. tropicalis* ATCC750

Resultado: Diferencia *C. albicans* das demais espécies.



Fonte: Autor

Vantagens dos novos métodos em relação às metodologias tradicionais

Métodos tradicionais

Identificação de agente de ITU:

- Os patógenos mais prevalentes são bactérias Gram-. E são identificados rotineiramente de maneira presuntiva em ágar CLED.

Identificação de agente de infecção em fluido vaginal:

- Os patógenos mais prevalentes são leveduras do gênero *Candida* e são identificados rotineiramente de maneira presuntiva em ágar diferencial (CHROMOagar Candida) ou sistemas de auxanogramas (API, Vitek)

Métodos inovadores

IPossibilita maior número de informações fenotípicas num mesmo meio para identificação presuntiva complementar que o ágar convencional não permite.

Exemplo:

- O acréscimo de SF ao ágar CLED ou ao ágar CHROMOagar Candida® pode gerar maior diversidade de padrões de emissão em relação às condições do ágar convencional.

Limitações do novo método

O método está limitado ao tipo de ágar que foi usado para sua padronização outros meios ou condições de cultivo necessitam de nova padronização para avaliar os padrões de emissão.

A toxicidade de alguns derivados pode levar à inibição completa de crescimento em placa. É obrigatório incubar junto placa inoculada com meio sem adição de SF.

SFs com baixa solubilidade no meio mesmo com uso de solvente devem ser evitados pois podem gerar resultados falsos negativos.

Sempre que possível usar adjuvantes (detergentes não iônicos) ou técnicas auxiliares de solubilização (formas micronizadas).

Alguns SFs podem apresentar fluorescência de baixa intensidade não detectável de maneira segura a olho nu. Para estes caso torna-se interessante adicionar ao meio adjuvantes de intensificação de fluorescência como ciclodextrinas.