



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

JUCIÊ FRANCO DE OLIVEIRA

**RELAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA NOVOBIOCINA RESISTENTE E PRODUÇÃO DE BIOFILME**

Natal – RN

2019

JUCIÊ FRANCO DE OLIVEIRA

**RELAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA NOVOBIOCINA RESISTENTE E PRODUÇÃO DE BIOFILME**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profª Drª Maíza Rocha de Abrantes  
Coorientador: Farmacêutico Msc. Francisco de Assis Bezerra Neto

Natal – RN

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Oliveira, Juciê Franco de.

Relação dos fatores de virulência de Staphylococcus coagulase negativa novobiocina resistente e produção de biofilme / Juciê Franco de Oliveira. - 2019.

48f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia. Natal, RN, 2019.

Orientadora: Maíza Rocha de Abrantes.

Coorientador: Francisco de Assis Bezerra Neto.

1. Staphylococcus - TCC. 2. Novobiocina - TCC. 3. Resistência a antibióticos - TCC. 4. Biofilme - TCC. I. Abrantes, Maíza Rocha de. II. Bezerra Neto, Francisco de Assis. III. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 579.852

JUCIÊ FRANCO DE OLIVEIRA

**RELAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA NOVOBIOCINA RESISTENTE E PRODUÇÃO DE BIOFILME**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maíza Rocha de Abrantes  
Coorientador: Farmacêutico Msc. Francisco de Assis Bezerra Neto

---

Presidente: Prof<sup>a</sup>. Maíza Rocha de Abrantes, Dr<sup>a</sup>. – Orientadora, UFRN

---

Membro: Prof. Iveraldo Amâncio da Silveira, Msc., UFRN

---

Membro: Biomed<sup>a</sup>. Camila Avelino de Macedo, Msc., Hospital Naval, Natal/RN

Natal, 05 de novembro de 2019

*“Aos meus pais Lucineide Barbosa de Oliveira, Raimundo Franco de Oliveira  
e amado Thales Rodrigo Targino de Lima”.*

## AGRADECIMENTOS

Venho agradecer aos meus familiares e amigos por acompanharem toda essa jornada, me fazendo sempre acreditar que era possível. Nada é fácil nessa vida e a permanência no curso nem sempre foi certa, mas graças a uma força maior tudo se resolveu e acabou bem.

Quero agradecer também a todos(as) professores(as) que contribuíram de algum modo para a formação do meu eu profissional e humano, em especial a minha orientadora Maiza Rocha de Abrantes e meu co-orientador Francisco de Assis Bezerra Neto por me influenciarem de maneira positiva e louvável quanto ao imenso mundo da microbiologia e das análises clínicas.

Sou grato aos grandes amigos que fiz durante todo o curso e que levarei por toda a vida, independente dos caminhos tomados por todos. Erivanessa Nara dos Santos que do nada chegou e me cativou de maneira que nem sei expressar, uma hora éramos dois estranhos, em outro momento já estávamos conversando sobre Deus e o mundo – a senhora é incrível! Larissa Ferreira Ribeiro de Oliveira, a menina prodígio monitora de todas as horas que de forma meiga e simples me conquistou – queria toda essa determinação que a senhora tem, te admiro por demais! Eva Themis, Denis Elvis, Christiane Negreiros, Antônia Eduarda, Mariana Farias, Antônio Miguel, Aline Vanessa e Antônia Carolayne muito obrigado por compartilharem tantos momentos, tenho certeza que serão profissionais incríveis.

Mais uma vez quero citar e agradecer meu coorientador Francisco por acreditar em minha pessoa e sempre estar lá com palavras e figurinhas de apoio.

Ao meu querido e amado Thales Rodrigo só tenho a agradecer por toda paciência, carinho e companheirismo durante todo o curso e construção desse trabalho.

Aos que compõem a banca de avaliação, meu muito obrigado por doarem um espacinho na agenda e seu e precioso tempo.

No mais, a microbiota que habita em mim saúda a microbiota que habita em você!

## RESUMO

Os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) têm sido reconhecidos nos últimos anos como importantes agentes de infecções nosocomiais. Esses microrganismos vêm apresentando multirresistência em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos no âmbito hospitalar, o que acaba dificultando a terapêutica dos pacientes, ocasionando um grave problema de saúde pública. O presente estudo teve como objetivo avaliar fatores de virulência de 24 cepas de SCN novobiocina resistente isoladas de mãos de integrantes de um programa de Residência Multiprofissional em Saúde e Residência em Ginecologia e Obstetrícia da Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC)/UFRN. Esse estudo é de caráter observacional do tipo transversal. O perfil de resistência das cepas isoladas foi realizado através do método de disco difusão com orientações do CLSI, sendo os fenótipos MR-SCN e MSL<sub>B</sub> avaliados pelo teste resistência à cefoxitina e D Teste, respectivamente. A produção de biofilme foi avaliada pela aderência em placas de 96 poços e fundo chato e posterior leitura em espectrofotômetro de luz UV. Os resultados demonstraram que 83,3% das cepas apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e 91,7% delas foram produtoras de biofilme em algum nível, sendo em frequentemente classificadas como fracamente produtoras. Os fenótipos MR-SCN e MSL<sub>B</sub> estavam presentes em apenas 8% e 12,5% das cepas, respectivamente. Foi observada uma relação direta entre a resistência aos antimicrobianos e a produção de biofilme, evidenciada graças ao perfil de multirresistência das cepas produtoras. Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com a literatura atual e evidenciam a importância de conhecer os principais mecanismos de resistência e virulência dos SNC que por muitas vezes são subestimados.

Palavras chave: *Staphylococcus*; Novobiocina; Resistência a antibióticos; Biofilme.

## ABSTRACT

Coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) have been recognized in recent years as important agents of nosocomial infections. These microorganisms have been presenting multiresistance due to the indiscriminate use of antimicrobials in hospitals, which makes it difficult to treat patients, causing a serious public health problem. The present study aimed to evaluate virulence factors and resistance profile of 24 strains resistant novobiocin SCN isolated from the hands of members of a Multiprofessional Health Residency program and Residency in Gynecology and Obstetrics of Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC)/UFRN. This is a cross-sectional observational study. The resistance profile of the isolated strains was performed by the manual disk diffusion method, being the phenotypes MR-SCN and MSL<sub>B</sub> evaluated by the cefoxitin resistance test and Test D, respectively. Biofilm production was evaluated by adherence to 96-well flat-bottom plates and further reading by UV light spectrophotometer. The results showed that 83.3% of the strains showed resistance to at least one of the tested antimicrobials and 91.7% of them were biofilm producers at some level, being often classified as poorly producing. The MR-SCN and MSL<sub>B</sub> phenotypes were present in only 8% and 12.5% of the strains, respectively. A direct relationship between antimicrobial resistance and biofilm production was observed, evidenced by the multiresistance profile of the producing strains. The results obtained in this study corroborate the current literature and highlight the importance of knowing the main mechanisms of resistance and virulence of the CNS that are often underestimated.

Keywords: *Staphylococcus*; Novobiocin; Antibiotic resistance; Biofilm.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Interpretação dos valores de DOfinal.	18
<b>Figura 2</b>	Teste D positivo.	20
<b>Figura 3</b>	Grupos e proporção de produção de biofilme.	20
<b>Figura 4</b>	Correlação produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos.	21

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Perfil de resistência dos SCN novobiocina resistente.	19
<b>Tabela 2</b>	Caracterização fenotípica, produção de biofilme e perfil de resistência.	22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMC</b>	Amoxicilina + Ácido clavulânico
<b>AMI</b>	Amicacina
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CFO</b>	Cefoxitina
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CLI</b>	Clindamicina
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CP</b>	Controle positivo
<b>DACT</b>	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DOc</b>	<i>Cut-off</i>
<b>DP</b>	Desvios padrão
<b>ERI</b>	Eritromicina
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FOP</b>	Forte Produtora
<b>FRP</b>	Fracamente produtora
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>IRAS</b>	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
<b>LNZ</b>	Linezolida
®	Marca Registrada
<b>MEJC</b>	Maternidade Escola Januário Cicco
<b>MP</b>	Moderadamente produtora
<b>MR-SCN</b>	Estafilococos coagulase-negativos resistentes à meticilina
<b>MSL<sub>B</sub></b>	Macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B
<b>NP</b>	Não produtora
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PEN</b>	Penicilina
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
<b>SCP</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva
<b>SUT</b>	Sulfametoxazol + Trimetoprim
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TEC</b>	Teicoplanina
<b>TSA1</b>	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

**TSA**      *Tryptic Soy Agar*  
**TSB**      *Tryptic Soy Broth*  
**UFC**      Unidade Formadora de Colônia  
**UFRN**     Universidade Federal do Rio Grande do Norte

**Artigo:** Relação dos fatores de virulência de *Staphylococcus* Coagulase Negativa novobiocina resistente e produção de biofilme. Enviado para publicação em \_\_\_\_\_ no periódico Revista Brasileira de Análises Clínicas – Brazilian Journal of Clinical Analysis, recebeu o número \_\_\_\_\_

**RELAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA NOVOBIOCINA RESISTENTE E PRODUÇÃO DE BIOFILME**

\*Juciê Franco de Oliveira <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduando do Curso de Farmácia – UFRN

Endereço para contato: Juciê Franco de Oliveira. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia – UFRN. Av. General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N, Petrópolis, Natal – RN, Brasil, 59012-570. Celular: (84) 9 8139-2235. E-mail: jucie.franco@hotmail.com.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
DESENHO DE ESTUDO.....	14
POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	15
ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS .....	15
ISOLADOS.....	15
IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO.....	15
REATIVAÇÃO DAS CEPAS .....	15
TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	16
DETECÇÃO FENOTÍPICA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA MSL <sub>B</sub> E MR-SCN .....	16
CONTROLE DE QUALIDADE.....	16
PREPARO, FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME.....	16
<i>Preparo do inóculo bacteriano</i> .....	16
<i>Obtenção do biofilme bacteriano</i> .....	17
<i>Leitura, quantificação do biofilme formado e interpretação dos resultados</i> .....	18
<i>Controle de qualidade</i> .....	18
<b>PROCESSAMENTO DOS DADOS</b> .....	18
<b>ÉTICA</b> .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	19
<b>DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>CONCLUSÃO</b> .....	24
<b>CONFLITO DE INTERESSE</b> .....	25
<b>SUPORTE FINANCEIRO</b> .....	25
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	25
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>ANEXO 1: NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS – BRAZILIAN JOURNAL OF CLINICAL ANALYSIS</b> .....	28
<b>ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE</b> .....	45

## INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas que microscopicamente manifestam-se na forma esférica (cocos) e agrupam-se semelhantes a “cachos de uvas”. São, ainda, catalase positiva, aeróbios ou anaeróbios facultativos e apresentam pouca exigência nutricional.<sup>(1)</sup> Atualmente, o gênero conta com cerca de 51 espécies e 27 subespécies e graças ao avanço das técnicas de identificação por meio de métodos moleculares, foi possível estabelecer e ampliar a nomenclatura das espécies que o compõe.<sup>(2)</sup>

A capacidade de coagular plasma sanguíneo é o principal diferencial dos dois grandes grupos pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, de um lado os *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP), representados principalmente pelo *S. aureus*, que apresentam uma “estafilocagulase” capaz de reagir com a protrombina e converter fibrinogênio em fibrina, coagulando o plasma; do outro lado os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), que por sua vez não expressam a enzima coagulase.<sup>(3)</sup>

Os SCN habitam normalmente a pele e mucosa de mamíferos, de forma comensal, e por muito tempo foram considerados não patogênicos.<sup>(4)</sup> Somente no final da década de 1980, Pfaller e Herwaldt<sup>(5)</sup> observaram e expuseram a relevância clínica dos SCN e, mais a frente, em meados dos anos 1990, Kloos e Bannerman<sup>(6)</sup>, reforçavam e atualizavam o meio científico e laboratorial quanto ao significado clínico destes.<sup>(7)</sup> Os SCN podem, também, ser divididos em dois grupos tomando por base sua suscetibilidade e resistência à novobiocina.<sup>(8)</sup>

Rotineiramente, o teste de avaliação de resistência à novobiocina é realizado com a finalidade de diferenciar *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, intrinsecamente resistente, de SCN clinicamente mais relevantes do grupo *Staphylococcus epidermidis* – suscetíveis à novobiocina.<sup>(7)</sup>

Nos últimos anos, os SCN novobiocina resistente emergiram e vem causando preocupação, uma vez que a literatura aponta estes microrganismos como agentes oportunistas de várias situações clínicas em pacientes imunocomprometidos, neonatos, idosos e portadores de dispositivos médicos.<sup>(7)</sup>

A capacidade dos SCN apresentarem multirresistência a antimicrobianos e antissépticos é consequência, principalmente, de uma pressão seletiva, causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente hospitalar e, também, por fatores relacionados a higiene, uma vez que a higienização insuficiente das mãos e bancadas é responsável tanto pela ocorrência de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) quanto pela disseminação de clones multirresistentes no ambiente hospitalar.<sup>(7)</sup>

A virulência bacteriana é definida por muitos autores, no aspecto clínico, como a capacidade do microrganismo, de modo inerente, causar algum dano ou manifestação clínica em um indivíduo por meio de fatores de virulência.<sup>(9)</sup> O gênero *Staphylococcus* apresenta diversos fatores de virulência dentre os quais destacam-se: fatores de adesão ou adesinas, proteínas associadas à produção de biofilme, enterotoxinas, hemolisinas, capacidade de evasão do sistema imune e genes de multirresistência.<sup>(3,4,9)</sup>

Em se tratando dos SCN, os fatores de virulência que ganham destaque são a produção de biofilme e os fenótipos de resistência aos antimicrobianos.<sup>(9)</sup> O biofilme nada mais é que uma matriz tridimensional e estruturada formada por bactérias e biopolímeros extracelulares preocupante no âmbito hospitalar por favorecer a aderência e colonização de dispositivos médicos.<sup>(4)</sup>

Os antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos são amplamente utilizados na prática clínica e rotineiramente o teste de resistência à meticilina, predispõe a resistência à essa classe, em se tratando de SCN, esse teste implica na pesquisa do fenótipo MR-SCN (estafilococos coagulase-negativos resistentes à meticilina).<sup>(10)</sup> Uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções estafilocócicas de caráter  $\beta$ -lactâmicos resistente é lançar mão de antimicrobianos não- $\beta$ -lactâmicos como as lincosamidas e os macrolídeos, por essa razão realiza-se a pesquisa do fenótipo MSL<sub>B</sub> (macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B).<sup>(11)</sup>

Neste sentido, esse estudo teve o intuito de avaliar a expressão de fatores de virulência de um banco de SCN novobiocina resistente isolados de mãos de profissionais integrantes de um programa de residência em saúde de um serviço de referência hospitalar em Natal/RN, tais como observar seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a capacidade de formar biofilme, a fim de obter dados que sirvam para auxiliar os profissionais da saúde na implementação de ações para controle e prevenção de infecção por essas bactérias no ambiente hospitalar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **DESENHO DE ESTUDO**

O presente estudo é de caráter observacional do tipo transversal.



## POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi incluso no estudo um banco composto por 24 cepas de SCN novobiocina resistente provenientes de mãos de participantes dos programas de Residência Multiprofissional em Saúde e Residência em Ginecologia e Obstetrícia, os quais integravam o quadro profissional da Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC) da UFRN no período de 2016 e 2018. Os mesmos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

### ISOLADOS

As amostras de mãos dos residentes pertencentes ao grande estudo “Avaliação da resistência bacteriana encontrada em isolados de mãos de colaboradores da equipe de saúde” foram coletadas, antes do início e ao término das atividades (antes da higienização das mãos), em *swabs* embebidos em salina estéril e encaminhadas em meio Stuart (Difco®) ao Laboratório de Microbiologia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), da UFRN para processamento. Após identificação, foi montado um banco de estirpes bacterianas composto por 24 cepas de SCN novobiocina resistente.

### IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO

As amostras foram semeadas nos meios Ágar Sangue (Difco®) e Ágar Manitol Salgado (Difco®), conforme descrito na metodologia microbiológica padrão.<sup>(12, 13)</sup> As bactérias isoladas em ágar manitol salgado foram avaliadas quanto a morfologia de colônia, coloração de Gram, testes bioquímicos como catalase, coagulase, DNase e, também, resistência à novobiocina (disco 5 µg), a fim de identificá-las.

As cepas foram, então, armazenadas em tubos contendo Ágar Nutriente (Difco®) a uma temperatura de 4°C, visando a sua conservação para utilização em ensaios posteriores.<sup>(14)</sup>

### REATIVAÇÃO DAS CEPAS

As estirpes armazenadas em Ágar Nutriente à 4°C foram reativadas por meio da inoculação de caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Difco®) aos tubos contendo as mesmas. Em seguida, cada tubo foi agitado em vórtex até obter-se uma suspensão bacteriana de aspecto leitoso. A suspensão foi, então, repicada em Ágar Manitol Salgado (Difco®) e incubada a 35±2°C por 24h para verificar a viabilidade das 24 cepas. Para o controle de crescimento destas, foi utilizada a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

## TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA1) foi realizado pelo método de disco-difusão, padronizado por Kirby-Bauer, 1966<sup>(15)</sup>, com base nas orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.<sup>(16)</sup>

Os antimicrobianos usados no TSA1 foram: Amicacina (AMI-30µg), Amoxicilina + Ácido clavulânico (AMC-30µg), Cefoxitina (CFO-30µg), Ciprofloxacino (CIP-30µg), Clindamicina (CLI-2 µg), Eritromicina (ERI-15µg), Gentamicina (GEN-10µg), Linezolida (LNZ-30µg), Penicilina (PEN-10µg), Sulfametoxazol + Trimetoprim (SUT-25µg) e Teicoplanina (TEC-30µg).

## DETECÇÃO FENOTÍPICA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA MSL<sub>B</sub> E MR-SCN

A pesquisa da prevalência do fenótipo MSL<sub>B</sub> foi dada pela utilização do método do Teste D que implica em verificar a resistência induzível da clindamicina (2µg) frente a eritromicina (15µg) quando estes são dispostos lado a lado no TSA1. O resultado do Teste D foi obtido após incubar os discos a 35±2°C por 24h, observando o tamanho da zona de cobertura do halo formado. A resistência induzida a clindamicina foi dada quando ocorreu formação de um halo em forma de “D” ao redor da clindamicina na área entre os dois discos (Teste D positivo).<sup>(10)</sup>

Para a pesquisa do fenótipo MR-SCN foi utilizado o método do disco-difusão de Kirby-Bauer<sup>(15)</sup> adicionando disco de cefoxitina (30 µg) como método de referência, com base nas normas do CLSI<sup>(16)</sup> realizando leitura após crescimento em Ágar Mueller-Hinton (Difco®) a 35±2°C por 24h.<sup>(17)</sup>

## CONTROLE DE QUALIDADE

Durante a identificação e realização do TSA1 do banco de SCN novobiocina resistente foram utilizadas como controle cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

## PREPARO, FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

### *Preparo do inóculo bacteriano*

Após reativação e verificação da viabilidade das cepas, estas foram semeadas por meio da técnica de esgotamento em meio TSA (*Tryptic Soy Agar* – Difco®) e em seguida incubadas

aerobicamente a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 24h. Após crescimento das culturas, foram feitas suspensões a partir de colônias isoladas em salina estéril 0,9%, com ajuste da turbidez à 0,5 na escala de McFarland ( $\sim 10^5$  UFC/mL).

#### *Obtenção do biofilme bacteriano*

O protocolo utilizado foi descrito por Stepanovic *et al.*, 2007<sup>(18)</sup> com modificações.

Para a obtenção do biofilme bacteriano foram utilizadas placas de 96 poços com fundo plano (INLAB<sup>®</sup>); meio TSB (*Tryptic Soy Broth* – Difco<sup>®</sup>) suplementado com 1% de glicose; e o inóculo padronizado e ajustado ao tubo 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 10^5$  UFC/mL).

Em cada poço da microplaca foi adicionado 180  $\mu\text{L}$  de meio TSB suplementado com 1% de glicose e 20  $\mu\text{L}$  do inóculo padronizado. Para cada cepa foi realizada uma análise em quintuplicata. O controle positivo (CP) foi preparado, também, com 180  $\mu\text{L}$  de meio TSB suplementado com 1% de glicose e 20  $\mu\text{L}$  do inóculo da cepa *Staphylococcus epidermidis* 70D, enquanto o controle negativo (CN) conteve apenas 200  $\mu\text{L}$  de TSB suplementado com 1% de glicose. Ao final, a microplaca foi devidamente tampada e incubada aerobicamente a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 24h.

Passado o tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado cuidadosamente e estes, por sua vez, lavados três vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para remoção de células planctônicas. Logo após, o biofilme foi fixado com 200  $\mu\text{L}$  de Metanol por 20 minutos. Após fixação o conteúdo da microplaca foi vertido cuidadosamente em recipiente adequado para descarte.

A camada de biofilme já fixada foi corada com 200  $\mu\text{L}$  de Cristal violeta 0,4% por 15 minutos à temperatura ambiente, tempo suficiente para que ocorra a penetração do biofilme pelo corante. Posteriormente, o excesso de corante foi retirado por lavagem em água corrente e a placa seca à temperatura ambiente. Com a placa já totalmente seca, o corante foi ressolubilizado, cuidadosamente, com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de etanol 95% por 30 minutos, neste tempo a placa permaneceu tampada, para evitar evaporação do álcool, e mantida em condições estáticas. Passado o tempo, a próxima etapa corresponde à leitura do conteúdo dos poços através da densidade óptica (DO) destes.

### *Leitura, quantificação do biofilme formado e interpretação dos resultados*

A DO será equivalente à quantidade de biofilme produzida que foi obtida por meio da leitura do conteúdo dos poços da microplaca em espectrofotômetro (EPOCHH – BioTek®, Winooski, Vermont, EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm.

Para o cálculo da DO de cada cepa e dos controles (CP e CN), utilizou-se a média de três valores distintos da quintuplicata. Além disso, foi estabelecido um *cut-off* (DOc), para cada placa, por meio da expressão  $DOc = DO \text{ média do CN} + (3 \times DP \text{ do CN})$ , ou seja, o *cut-off* é definido como três desvios padrão (DP) acima do DO médio do controle negativo. O valor final da DO de cada cepa é então definido pela diferença entre a DO média por cepa e o DOc ( $DO_{\text{final}} = DO \text{ médio por cepa} - DOc$ ). Sendo assim, cada resultado será expresso em números, qualquer valor negativo será representado como zero (ausência de produção de biofilme), enquanto qualquer valor positivo indica produção. A Quadro 1 indica como os resultados de  $DO_{\text{final}}$  devem ser interpretados.

<b>Condição</b>	<b>Resultado</b>
Se $DO \leq DOc$	Não produtora (NP)
Se $DOc \leq DO \leq 2*DOc$	Fracamente produtora (FRP)
Se $2*DOc \leq DO \leq 4*DOc$	Moderadamente produtora (MP)
Se $4*DOc \leq DO$	Forte Produtora (FOP)

DO: densidade óptica; DOc: *cut-off*.

**Figura 1** – Interpretação dos valores de  $DO_{\text{final}}$ .

Fonte: Adaptado de Stepanovic *et al.*, 2007. <sup>(18)</sup>

### *Controle de qualidade*

Durante a realização do ensaio para obtenção do biofilme bacteriano foram utilizadas cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus epidermidis* 70D.

## **PROCESSAMENTO DOS DADOS**

Os resultados obtidos foram reunidos em planilhas do programa Microsoft Excel® 2016 e submetidos à análise. O plano de análise de dados incluiu: correlacionar o perfil de resistência com os fatores de virulência das cepas do presente estudo. Em seguida foi realizada uma análise crítica dos resultados.

## ÉTICA

A investigação apresentou riscos mínimos para os residentes estudados. O protocolo (CAAE: 65861417.0.0000.5292) foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL, cujo número do parecer foi 1.808.266.

## RESULTADOS

O perfil de resistência do banco, contendo as 24 cepas está presente nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Perfil de resistência dos SCN novobiocina resistente.

Antimicrobianos	Resistência n (%)
AMI	0 (0)
AMC	1 (4)
CFO	2 (8)
CIP	0 (0)
CLI	10 (38)
ERI	15 (58)
GEN	2 (8)
LNZ	0 (0)
PEN	14 (54)
SUT	4 (17)
TEC	0 (0)

AMI: Amicacina; AMC: Amoxicilina + Ácido clavulânico; CFO: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacino; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; LNZ: Linezolida; PEN: Penicilina; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; TEC: Teicoplanina.

Fonte: Dados da pesquisa.

Foi encontrado maior prevalência de resistência aos antimicrobianos eritromicina (n = 15; 58%); clindamicina (n = 10; 38%) e penicilina (n = 14; 54%) – Tabela 1 –, os quais pertencem às classes macrolídeos, lincosamidas e  $\beta$ -lactâmicos, respectivamente.

Mesmo com maior prevalência de resistência a eritromicina e clindamicina, não foi observada maior incidência do fenótipo MSL<sub>B</sub>, uma vez que apenas três (12,5%) das cepas apresentaram Teste D positivo (Figura 2), enquanto o fenótipo MR-SCN foi encontrado em apenas dois (8%), como mostra a Tabela 2.

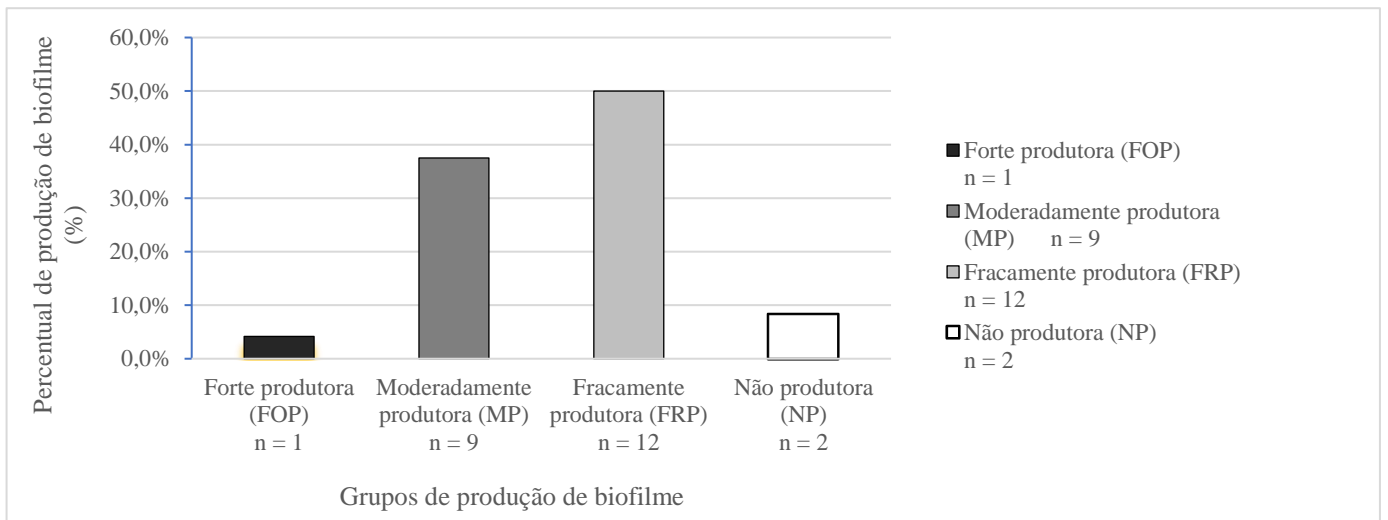


**Figura 2** – Teste D positivo.

Fonte: Noel *et al.*, 2017.<sup>(17)</sup>

O presente estudo mostra ainda, Tabela 2, que os SCN novobiocina resistente podem apresentar multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos, como a cepa exemplar 34A que apresenta resistência a alguns  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas, etc.

Para a avaliação da produção de biofilme, as 24 cepas de SCN novobiocina resistente foram divididas em quatro grupos quanto a proporção de produção do biofilme, os quais podem ser observados no Figura 3 e na Tabela 2.

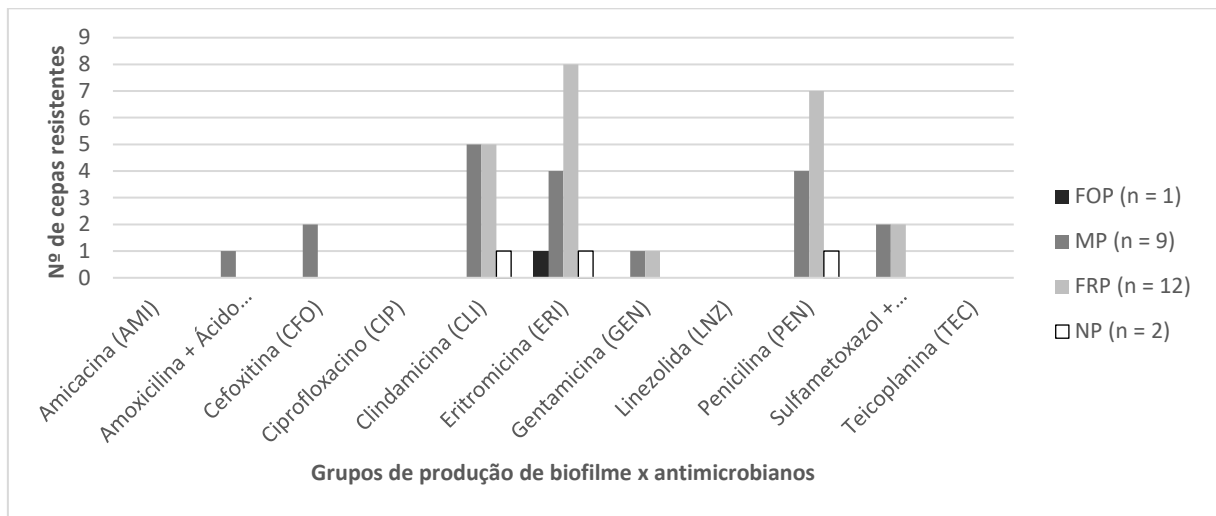


**Figura 3** – Grupos e proporção de produção de biofilme.

Fonte: Dados da pesquisa.

Como observado no Figura 3, 50% das cepas (n = 12) produziram biofilme de maneira mais branda – FRP – e 37,5% (n = 9) mostraram-se moderadamente produtora (MP). Os menores índices de produção de biofilme foram observados nos extremos da classificação, onde apenas uma das cepas (4,2%) apresentou-se como FOP e duas cepas (8,3%) se comportaram como NP de biofilme.

Os resultados do perfil de resistência frente aos antimicrobianos e da produção de biofilme foram cruzados para verificar sua correlação, expresso no Figura 4.



**Figura 4** – Correlação produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos.

Fonte: Dados da pesquisa.

Quanto a relação produção de biofilme-resistência antimicrobiana, foi observado que mesmo as cepas NP de biofilme apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. No entanto, quando comparado cepas NP de biofilme às cepas produtoras, o presente estudo observou que há prevalência de multirresistência e/ou resistência a um número maior de antimicrobianos associada à produção de biofilme (Figura 4). Isso se reforça na Tabela 2, quando ao comparar cepas representantes do grupo produtor e NP de biofilme, 24A e 18A, respectivamente, observa-se resistência a cinco dos onze antimicrobianos testados para a cepa 24A e para a cepa 18A apenas dois encontram-se resistentes.

**Tabela 2 – Caracterização fenotípica, produção de biofilme e perfil de resistência.**

Cepas	Antimicrobianos e perfil de resistência													Formação de Biofilme	Fenótipo MSLB (Teste D)	Fenótipo MR-SCN
	AMI	AMC	CFO	CIP	CLI	ERI	GEN	LNZ	PEN	SUT	TEC					
1B	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	MP	-	+	
3B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	FRP	-	-	
4A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	FRP	-	-	
5A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MP	-	-	
5B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	FRP	-	-	
13A	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	MP	-	-	
13B	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	FRP	-	-	
15B	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	FRP	-	-	
16B	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	FRP	+	-	
17B	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	FRP	+	-	
18A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	NP	-	-	
20B	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	FOP	-	-	
21A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MP	-	-	
24A	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	MP	-	-	
24B	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	FRP	-	-	
27A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	MP	+	-	
27B	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	FRP	-	-	
28A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MP	-	-	
34A	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	MP	-	+	
35B	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	FRP	-	-	
36B	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	MP	-	-	
41B	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	NP	-	-	
42B	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	FRP	-	-	
44A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	FRP	-	-	

AMI: Amicacina; AMC: Amoxicilina + Ácido clavulânico; CFO: Ceftioxiina; CIP: Ciprofloxacino; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; LNZ: Linezolida; PEN: Penicilina; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; TEC: Teicoplanina; S: Sensível; R: resistente; FRP: fracamente produtora; MP: moderadamente produtora; NP: não produtora; FOP: forte produtora; (+): positivo; (-): negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.



## DISCUSSÃO

A emergência das infecções associadas com a assistência à saúde constitui um grande problema de saúde pública, tendo em vista que as IRAS se encontram entre as principais causas de morbidade e mortalidade dentro das instalações públicas e privadas de saúde, gerando um aumento nos gastos com os devidos tratamentos dos pacientes assistidos.<sup>(19)</sup> Além disso, o aumento expressivo de microrganismos resistentes às diversas classes de antimicrobianos constitui um alerta para o uso indiscriminado e inadequado dos antimicrobianos, demonstrando a necessidade de intervenções efetivas no controle e prevenção das IRAS.<sup>(20)</sup>

Foi observado uma alta taxa de prevalência de cepas resistentes (n = 20; 83,3%), as quais apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Dentro desse grupo, houve uma maior resistência à eritromicina (n = 15; 58%), clindamicina (n = 10; 38%) e penicilina (n = 14; 54%), sendo estes resultados semelhantes aos encontrados em estudo recente feito por Ortega-Peña *et al.*<sup>(21)</sup>, que avaliaram SCN associadas a infecções de próteses articulares com um perfil de resistência para a eritromicina (39%), clindamicina (23%) e penicilina (80%) também relevantes. Por outro lado, Noel *et al.*<sup>(17)</sup> obtiveram como resultados um perfil de multirresistência elevado em cepas isoladas de objetos inanimados (jaleco, estetoscópio e maçaneta) em um Hospital Universitário, com um padrão resistente a cefalotina (64,4%), cefoxitina (79,7%), oxacilina (84,7%), ceftriaxona (62,7%), ciprofloxacina (57,6%), clindamicina (74,6%), linezolida (59,3%), entre outros, para isolados de estafilococos.

Dentre os 24 SCN novobiocina-resistente estudados no presente trabalho, o fenótipo MSL<sub>B</sub> esteve presente em apenas 12,5% das cepas, o qual foi evidenciado pelo Teste D positivo. Este achado foi condizente com os resultados descritos por Ahmed *et al.*<sup>(22)</sup>, onde foi observada uma prevalência de 10% dos SCN, os quais apresentaram a resistência induzível à clindamicina *in vitro*; e também aos resultados obtidos por Gatermann *et al.*<sup>(23)</sup>, dentre os quais 25,6% da população de SCN resistente à eritromicina apresentou resistência induzida à clindamicina.

Outro fenótipo de grande importância é o MR-SCN que predispõe a resistência à meticilina, penicilina semissintética, em estafilococos coagulase negativa. Os resultados obtidos nesse estudo vão ao encontro com os de García e colaboradores.<sup>(11)</sup>

Mediante o supracitado, vale ressaltar a importância de conhecer os mecanismos de resistência e ação dos antimicrobianos para entender, então, o grau de seletividade e toxicidade aos microrganismos, contribuindo para o direcionamento farmacoterapêutico e seu uso racional.<sup>(24)</sup>

A produção de biofilme é citada por alguns autores<sup>(21, 25)</sup> como um dos principais fatores de virulência associado a SCN. Um estudo comparativo avaliou a sensibilidade e

precisão de três métodos comumente utilizados na quantificação/produção de biofilmes, dentre eles o teste de aderência de tubos, método do ágar vermelho do congo e método da placa de cultura de tecidos de 96 poços com fundo chato, este último foi, então, classificado como padrão ouro por apresentar maior índice de sensibilidade e precisão entre os demais, e por esse motivo está incluso na metodologia desse estudo.<sup>(26)</sup>

Dentre as 24 cepas que compõem o banco, 22 (91,7%) expressaram algum nível de produção de biofilme. Shrestha e colaboradores<sup>(26)</sup> avaliaram a formação de biofilme em cepas de SCN de um Hospital no leste do Nepal, com metodologia semelhante a esse estudo, baseada na utilização de placas de 96 poços com fundo chato, e com isso, observaram que 65% de seus isolados eram produtores de biofilme. Esse mesmo estudo correlacionou a produção de biofilme com a prevalência de resistência a múltiplos antimicrobianos e apresentou resultados condizentes com os nossos.

Um outro estudo realizado em um Hospital Universitário Sul Fluminense<sup>(18)</sup> avaliou a formação de biofilme em cepas de SCN novobiocina resistente provenientes de objetos inanimados pertencentes ao local, utilizando a mesma metodologia do presente estudo, obtendo resultados semelhantes aos apresentados acima. Sendo assim, infere-se que a produção de biofilmes é nitidamente um fator de virulência de extrema importância que pode contribuir para o aumento da morbimortalidade de pacientes em ambiente hospitalar, uma vez que esses complexos microbianos possuem a capacidade de suportar concentrações de antimicrobianos que normalmente eliminariam células planctônicas em condições normais.<sup>(27)</sup>

## CONCLUSÃO

Diante dos dados e informações discutidos, conclui-se o quão importante é a compreensão dos mecanismos de virulência dos patógenos colonizadores das instituições de saúde, com enfoque nos SCN, uma vez que estes apresentam-se como agentes oportunistas e por muitas vezes são subestimados.

Os resultados apontam a importância da compreensão, de modo aprofundado, dos mecanismos moleculares da formação de biofilme para desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas eficientes contra os SNC, uma vez que a formação de biofilme pode diminuir a suscetibilidade frente aos antimicrobianos, diminuindo o prognóstico do paciente.

Conclui-se, ainda, o quão importante é a prática de higiene hospitalar para a prevenção da disseminação de genes de resistência e surgimento das IRAS, por tanto, é de grande importância que se proponha reforços, não somente à MEJC/UFRN como também às demais instituições de saúde, no tocante ao controle, combate e vigilância de infecções hospitalares.

**CONFLITO DE INTERESSE**

Não foram observados conflitos de interesse.

**SUPORTE FINANCEIRO**

O trabalho percorreu na forma autofinanciada.

**AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a toda equipe da Maternidade Escola Januário Cicco e do Laboratório de Microbiologia – DACT, UFRN, pelo suporte na realização do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- 1 – Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. ScienceDirect: International Journal of Food Microbiology. 2008 Sep 01;126(3):302-310.
- 2 – Balbutskaya AA, Dmitrenko OA, Skvortsov VN. The modern characteristics of species identification of coagulase-positive bacteria of Staphylococcus genus. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 497-502.
- 3 – Costa MG, Pereira UP, Custódio DAC., Silva N. Caracterização de Staphylococcus coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2011; 70(4):584-8.
- 4 – Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent?. Clinical Microbiology and Infection. 2018 Nov. 28;25(9):1071-1080.
- 5 – Pfaller MA, Herwaldt LA. Aspectos laboratoriais, clínicos e epidemiológicos dos estafilococos coagulase-negativos. Clin Microbiol Rev . Julho de 1988; 1 (3): 281-99
- 6 – Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 1994 Jan;7(1):117-40.
- 7 – Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 2014 Oct;27(4):870-926.
- 8 – Von Eiff C, Proctor RA, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. Postgraduate Medicine. 2015 Jun. 30;110(4):63-76.
- 9 – Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. Int J Mol Sci. 2019 Mar 11;20(5):1215.
- 10 – Ozer T. T. The Rate of Inducible MLSB Resistance in the Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated From Clinical Samples. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2015 Oct 23;30(5):490-493.
- 11 – García A, Martínez C, Juárez RI, Téllez R, Paredes MA, Herrera MR, et al. Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de Staphylococcus aureus y Staphylococcus coagulasa negativa en México. Biomédica. 2019;39:513-23.
- 12 – Konemam EW *et al.* Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. São Paulo: Editora Médica e Científica Ltda.2007.
- 13 – Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3ª ed., Editora Sarvier. 2010.
- 14 – Perry SF. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Mol Biotechnol. 1998 Feb;9(1):59-64.
- 15 – Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493.

- 16 – Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests, Document n° M100-S23. 23rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2013.
- 17 – Noel CC, Silvério FM, Francisco NLSG, Almeida NR, Soares LC. Antimicrobial Susceptibility and Virulence Factors of Staphylococcus in Fomites of Sul Fluminense University Hospital. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2017 Mar 21;21(3):245-254.
- 18 - Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;115:891-9.
- 19 – Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*. Dez 2013 14(22):113-238.
- 20 – Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Brasília: ANVISA, 2017.
- 21 – Ortega-Peña S, Franco-Cendejas R, Salazar-Sáenz B, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC. Prevalencia y factores de virulencia de Staphylococcus coagulasa negativos causantes de infección de prótesis articular en un hospital ortopédico de México. *CIRUGÍA y CIRUJANOS*. 2019 Feb 05;(87):428-435.
- 22 - Ahmed DM, Messih MAWA, Ibrahim NH, Meabed MH, Abdel-Salam SM. Frequency of icaA and icaD determinants and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci associated with nasal carriage in neonatal intensive care units. *Germes*. 2019 Jun 3;9(2):61-70.
- 23 – Gatermann SG, Koschinski T, Friedrich S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(8):777-81.
- 24 - Franco JMPL, Mendes RC, Cabral FRF, Menezes CDA. O papel do Farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. *Semana Acadêmica*. 2015 Sep 24;1(72):1-17.
- 25 - Rampelotto R F, Lorenzoni VV, Silva DC, Coelho SS, Wust V, Garzon LR *et al*. Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2018 Dec; 51(6):761-767.
- 26 – Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Aug 31(6):89.
- 27 – Hall, Clayton W, Mah, Thien-Fah. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*. May 2017 41(3):276-301.

## ANEXO 1: NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS – BRAZILIAN JOURNAL OF CLINICAL ANALYSIS

### **SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS ®**

### **REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS**

### **Brazilian Journal of Clinical Analysis**

### **ISSN 0370-369-X - VERSÃO IMPRESSA**

### **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

A Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC) é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), tendo sido criada em 1969. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). No Qualis-Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a RBAC se encontra nos seguintes estratos por área de avaliação: B4: interdisciplinar, saúde coletiva e biotecnologia; B5: farmácia, medicina I, II e III, medicina veterinária e odontologia.

### **NORMAS PARA PUBLICAÇÃO**

A Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC) é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária. Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a **Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais**, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em “.pdf”. As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse

é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 196/96) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em “.pdf” da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA) deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado explicitamente no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em “.pdf” da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A Revista Brasileira de Análises Clínicas apóia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde (OMS), do International Committee of Medical Journal Editor (ICMJE) e do Workshop ICTPR. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR), International Standard

Randomised Controlled Trail Number (ISRCTN), Netherlands Trial Register (NTR), UMIN Clinical Trials Registry (UMIN-CTR), WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos – ReBEC (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>) do Ministério da Saúde (DECIT/MS), Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos. Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pelo menos dois pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados serão informados e devolvidos aos autores.

A Revista Brasileira De Análises Clínicas está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Educação Continuada em Análises Clínicas



Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

**Artigos Originais:** trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**Artigos de Revisão:** trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**Artigo de Atualização:** trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os artigos de atualização deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**Comunicações Breves:** trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. As comunicações breves deverão ser estruturadas de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**Relato de Caso:** trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínicolaboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**Imagens em Análises Clínicas:** máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em “.jpg” ou “.tif” e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

**Carta ao Editor:** correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnicocientíficos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

**Editoriais:** escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da Revista Brasileira de Análises Clínicas. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A Revista Brasileira de Análises Clínicas avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é enfaticamente estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, esteja familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a seguinte normalização técnica:

<b>ARTIGO ORIGINAL</b>	
<b>Título Completo</b>	<b>Complete Title</b>
<b>Incluir Versão em Inglês</b>	<b>Incluir Versão em Português</b>
<b>Título Corrido</b>	<b>Running Title</b>
<b>Incluir Versão em Inglês</b>	<b>Incluir Versão em Português</b>
<b>Autores</b>	<b>Authors</b>
<b>Resumo</b>	<b>Summary</b>
<b>Incluir Versão em Inglês</b>	<b>Incluir Versão em Português</b>
<b>Introdução</b>	<b>Introduction</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>Material and Methods</b>
<b>Ética</b>	<b>Ethics</b>
<b>Resultados</b>	<b>Results</b>
<b>Discussão</b>	<b>Discussion</b>
<b>Conclusão</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Conflito de interesse</b>	<b>Conflicts of Interests</b>
<b>Suporte Financeiro</b>	<b>Funding Sources</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>Acknowledgements</b>
<b>Referências</b>	<b>References</b>

**TÍTULO COMPLETO:** Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (excetuando-se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

**TÍTULO CORRIDO:** Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.

**AUTORES:** Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

**RESUMO:** Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

**PALAVRAS-CHAVES:** deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS (Descritores em Ciências da Saúde), elaborado pela Bireme, e/ou MeSH (Medical Subject Headings), elaborado pelo NLM (National Library of Medicine). Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

**INTRODUÇÃO:** Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também claramente indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

**ÉTICA:** Nesta seção, deverá ser declarado textualmente o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando claramente o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

**RESULTADOS:** Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Assim, apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

**DISCUSSÃO:** Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

**CONCLUSÕES:** Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

**CONFLITOS DE INTERESSE:** Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito “Não há conflitos de interesse”.

**SUPORTE FINANCEIRO:** Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

**AGRADECIMENTOS:** Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

**TABELAS:** O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto [ou amostra] a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra “Tabela”, seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas de rodapé [legendas], indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de

tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excell e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

**FIGURAS:** Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Estas ilustrações deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução

(mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato “.jpg” ou “.tif” e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excell em formato “.doc” ou “.xls” e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato

MS-Excell, caso não seja possível converter para formato “.tif”. Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações irão ser colocadas, deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

**REFERÊNCIAS:** As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédicas) pelo International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE] (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em [www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf) (Versão em Português) ou em [www.icmje.org/urm\\_full.pdf](http://www.icmje.org/urm_full.pdf) (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em List of Journals Indexed in Index Medicus [National Library For Medicine] (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de

referências numa mesma citação. A lista apresentada no final do trabalho científico deverá ser numerada de forma consecutiva e os autores deverão ser mencionados de acordo com a ordem em que foram citados no texto. Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de “resumo”, “dados não publicados”,

“comunicações pessoais” ou “no prelo” poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores. As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

**TEXTO:** Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chamada Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parêntesis. Neste sistema, os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

**Observações Gerais:**

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula “e” entre os sobrenomes;
- Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina “et al.” em itálico;
- Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento, deverão ser indicados/ tratados como autores;
- Nomes contendo mais de um sobrenome, deverá ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como “de” ou “da”;
- Sobrenomes duplos, com hífen ou apóstrofos ou que formem uma expressão, deverão ser indicados em seu conjunto;
- Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

**Alguns exemplos de citações:**

- Um/ dois autores: No mesmo ano, Nishimura e Miyaji(26) mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.

- Mais de dois autores: Giannopoulos et al.(32) também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.
- Autores corporativos: De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes,(17) os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).
- Editores/ Projetos editoriais: Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,(5) a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias. Sem indicação de nome de autor: O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.

**AUTORES:** Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. Todos os autores deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

**Observações Gerais:**

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livedocência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da



Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.

**TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS:** Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra do título deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

**TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO:** Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

**MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS:** O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais [445-449, utilizar: 445-9].

**EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO:** As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra “edição” no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição;

**PARÁGRAFOS:** Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

**Alguns exemplos de referências:**

**Periódicos:**

- Um Autor: Marques SA. Paracoccidioidomycosis. Clin Dermatol. 2012 Nov;30(6):610-5.

- Mais de um autor: Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. *Singapore Med J.* 2012 Sep;53(9):604-7.
- Até seis autores: Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. *Intern Med.* 2012;51(20):2967-71.
- Mais de seis autores: Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Govender N, Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Johnson E, Kidd S, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martins MA, Meis JF, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pfaller MA, Schell WA, St-Germain G, Trilles L, Turnidge J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii Species*

**Complex:** an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff

**Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. Antimicrob Agents Chemother.** 2012 Nov;56(11):5898-906.

**Autores pessoais e corporativos: Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD,**

**McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur**

**DC; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous**

**Terminology Standardization Project for HPVAssociated**

**Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. J Low Genit Tract Dis.** 2012 Jul;16(3):205-42.

- Volume com suplemento: Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.
- Número com suplemento: Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control.* 2012 Oct;19(4 Suppl):4-15.
- Editorial com indicação de autoria: Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int.* 2012 Sep;61(3):351-2.

- Editorial sem indicação de título: Bartels PD. Editorial. Ugeskr Laeger. 2012 Oct 15;174(42):2518.
- Artigo/ Editorial sem indicação de autoria: Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. Proteomics. 2012 Oct;12(19-20):2902-3.
- Carta ao editor: Dettenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. Dtsch Arztebl Int. 2010 Feb;107(8):139.
- Artigo com DOI: Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. Pediatrics. 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.
- Autor corporativo: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012 Oct 19;61:839-42.

#### **Livros:**

- Um autor/ mais de um autor: Stockham SL, Scott MA. Fundamentos da Patologia
- Autor de obra e de capítulo: Rey L. Bases da parasitologia médica. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

**Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Pentead MV. Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

- Responsabilidade intelectual destacada: Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. Ética em pesquisa: temas globais. Brasília: Editora UNB; 2008. Teses, Dissertações e Monografias:
- Autor e indicação de grau: Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

#### **Eventos Científicos:**

- **Anais com indicação de título: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife,**

**Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.**

- **Anais com indicação de autoria, trabalho e título: Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH,**

**Dornelas-Ribeiro M, Maia S, Silva M, Lazéra M. Espécies de Candida isoladas de pacientes leucêmicos. In:**

**Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil.**

**Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.. p. 314.**

**Órgãos/ Instituições:**

- **Um autor corporativo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).**  
**Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.**
- **Mais de um autor corporativo: Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Relatório de atividades: 2006. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.**

**Referências Legislativas:**

- **Leis: Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União 20 set 1990; seção 1.**
- **Decretos: Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. Diário Oficial da União 29 jun 2011; seção 1.**
- **Portarias: Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. Diário Oficial da União 13 mai 1998; seção 1.**
- **Resoluções: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005.**

**Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos.**

**Diário Oficial da União 14 out 2005; seção 1.**

**Meios Eletrônicos:**

- **Periódicos: Mondelli AL, Niéro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder- Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. Candida spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.**
- **Referências legislativas: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. Diário Oficial da União 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgr/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.**
- **Eventos Científicos: Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus Paracoccidioides brasiliensis. In: 4. Congreso Virtual de Micología de Hongos Patógenos en América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.**

**A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo Sistema de Gestão de Publicações (SGP), no endereço: [www.sgponline.com.br/rbac/sgp](http://www.sgponline.com.br/rbac/sgp). Outras formas de submissão, não serão aceitas.**

**Observações Gerais:**

- **A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por email, sobre qualquer mudança de status;**
- **Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de login e senha;**

- **A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;**
- **O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;**
- **Pedidos de fast-track poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pósgraduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores.**
- **Os pedidos de fast-track deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.**

**ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE**

**EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS  
HOSPITALARES  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES  
GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE**

Este é um convite para você participar da pesquisa: “Avaliação da resistência bacteriana encontrada em isolados de mãos de colaboradores da equipe de saúde”, que tem como pesquisadora responsável Maiza Rocha de Abrantes.

Esta pesquisa pretende avaliar a prevalência de micro-organismos e o perfil de resistência bacteriana encontrada em isolados de mãos de colaboradores da equipe de saúde de um serviço de referência hospitalar da UFRN (MEJEC), no período de abril a dezembro de 2017.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é que os resultados observados alertem os profissionais acerca do fenômeno de resistência bacteriana e auxilie na implementação de ações para controle e prevenção da mesma.

Sua participação consiste em permitir a coleta de “swabs” de mãos que será realizada em períodos distintos, de forma que se possa acompanhar a prevalência e evolução da resistência bacteriana. Nesse documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) estão às informações a respeito desse trabalho. Você deverá ler esse documento ou pedir que eu leia para você. Uma vez esclarecida e caso você concorde em participar, será convidado a assiná-lo.

O risco de isto provocar algum tipo de prejuízo para você é mínimo, ou seja, o risco que você corre é semelhante àquele sentido num exame físico de rotina. Em caso de algum problema que você possa ter, relacionado com a pesquisa, será indenizado de todas as casuais despesas que tiver por estar participando nesse estudo.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Professora Maiza Rocha de Abrantes,  
(84)33429797/ (84)33429829 ou pelo E-mail: [maizarab@gmail.com](mailto:maizarab@gmail.com)

Você tem o direito de recusar a não participar deste estudo ou mesmo participando poderá retirar seu consentimento, em qualquer momento da pesquisa, sem nenhum prejuízo. Você não receberá remuneração por sua participação. Entretanto se você tiver algum gasto pela sua participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar, sua identidade será mantida em sigilo durante todo o estudo.

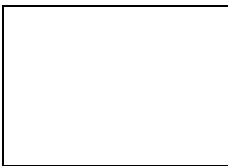
Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro, por um período de cinco anos.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes, telefone 3342-5003, endereço: Av. Nilo Peçanha, 620 – Petrópolis – Espaço João Machado - 1<sup>o</sup> Andar – Prédio Administrativo - CEP 59.012-300 – Natal/RN, e-mail: [cep\\_huol@yahoo.com.br](mailto:cep_huol@yahoo.com.br)

Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável, Professora Maiza Rocha de Abrantes.

### **Consentimento Livre e Esclarecido**

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa “Avaliação da resistência bacteriana encontrada em isolados de mãos de colaboradores da equipe de saúde”, e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

		Natal ___/___/___
Assinatura do participante da pesquisa	Impressão datiloscópica	

Rubrica do Participante / Responsável legal	Rubrica do Pesquisador





**EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS  
HOSPITALARES  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES  
GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA**



**Declaração do pesquisador responsável**

Como pesquisador responsável pelo estudo “Avaliação da resistência bacteriana encontrada em isolados de mãos de colaboradores da equipe de saúde”, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e de direito que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Natal \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Maiza Rocha de Abrantes

Rubrica do Participante / Responsável legal	Rubrica do Pesquisador