

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Taís Soares Martins

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS LEVEDURIFORMES
EM MEIOS DE PRESERVAÇÃO PARA TRANSPLANTE DE CÓRNEA
A PARTIR DA TÉCNICA DE *MALDI-TOF***

Porto Alegre

2019

Taís Soares Martins

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS LEVEDURIFORMES
EM MEIOS DE PRESERVAÇÃO PARA TRANSPLANTE DE CÓRNEA
A PARTIR DA TÉCNICA DE *MALDI-TOF***

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Profa. Dra. Mercedes Passos Geimba
Co-orientador: Fernando Pagnussato

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

MARTINS, TAÍS
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS LEVEDURIFORMES
EM MEIOS DE PRESERVAÇÃO PARA TRANSPLANTE A PARTIR DA
TÉCNICA DE MALDI-TOF / TAÍS MARTINS. -- 2019.
33 f.
Orientador: MERCEDES GEIMBA.

Coorientador: FERNANDO PAGNUSSATO.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, MICROBIOLOGIA CLÍNICA,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. BANCO DE TECIDOS. 2. TRANSPLANTE DE CórNEA. 3.
MEIOS DE PRESERVAÇÃO. 4. MALDI-TOF. 5. ENDOFTALMITES.
I. GEIMBA, MERCEDES, orient. II. PAGNUSSATO,
FERNANDO, coorient. III. Título.

RESUMO

Os avanços científicos e tecnológicos que vem ocorrendo no mundo e no Brasil têm resultado no aumento significativo do número de transplantes, embora estes ainda sejam insuficientes diante da enorme demanda de órgãos e tecidos do país. Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes – RBT, foram realizados 14.809 transplantes de córneas em 2018 no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul responsável pela realização de 617 transplantes, porém o Estado soma um total de 49 pacientes em lista de espera. Atualmente temos 53 Bancos de Olhos em funcionamento no Brasil. Entre os transplantes realizados, o de córnea é o procedimento de transplante tecidual de grande sucesso em humanos e o mais realizado. O procedimento de transplante de córnea consiste em substituir a porção debilitada da córnea de um paciente por uma córnea saudável, oriunda de um doador. Apesar dos meios de conservação apresentarem substâncias antimicrobianas na sua composição, trabalhos mostram a permanência de microrganismos resistentes como o *Staphylococcus aureus*, estreptococos, bacilos gram-negativos como a *Klebsiella* que podem ocasionar infecções pós transplante. A introdução do meio de preservação de córneas de médio prazo no Brasil ocorreu há mais de dez anos. Dois meios vem sendo utilizados na preservação de córneas no país, o Optisol-GS® (Bausch e Lomb, EUA) e o Eusol-C® (Al.Chí.Itália). O método MALDI-TOF consiste em um sistema na qual o material biológico é colocado em uma placa em que há uma matriz polimérica. Com um laser, a amostra é irradiada onde há ionização de várias moléculas, que são aspiradas e levadas até o detector. A grande vantagem deste método é a identificação rápida e com o mínimo de preparo da amostra, o que leva a uma grande economia de tempo.

Palavras chave: Banco de tecidos. Transplante de córneas. Meios de preservação. MALDI-TOF. Endoftalmites.

ABSTRACT

The scientific and technological advances that have been taking place in the world and in Brazil have a great impact on the number of transplants, although these are insufficient due to the enormous demand for organs and tissues in the country. According to the Brazilian Registry of Transplantation – RBT, 14.809 cornea transplants were performed in 2018 in Brazil, and Rio Grande do Sul is responsible for 617 transplants, but a total of 49 patients in the waiting list. Currently we have 53 Eye Banks in operation in Brazil. Among the transplants performed, corneal transplantation is the most successful human transplantation procedure and the one performed. The corneal transplant procedure consists of replacing the weakened portion of a patient's cornea with a healthy cornea from a donor. Although preservation media are important as antimicrobials in their composition, the studies show a permanence of resistant microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *streptococci*, gram-negative bacilli such as *Klebsiella* that are a post-transplant lesion. From the expiration of ten years. Two averages have been used in the protection of corneas in the country, Optisol-GS® (Bausch and Lomb, USA) and Eusol-C® (Al.Chi.Italia). The MALDI-TOF method consists of a system in which the biological material is placed on a plate in which there is a polymer matrix. With a laser, a sample is irradiated where there is ionization of several molecules, which are aspirated and taken to the detector. The great advantage of this method is a quick identification with minimal preparation of the sample, which leads to a great saving of time.

Keywords: Tissue bank. Transplant of corneas. Means of preservation. *MALDI-TOF*. Endophthalmitis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	OBJETIVOS	9
1.1.1	Objetivo geral	9
1.1.2	Objetivos específicos.....	9
2	ARTIGO CIENTÍFICO	10
3	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	21
	REFERÊNCIAS	22
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA X	244

1 INTRODUÇÃO

Os avanços científicos e tecnológicos que vem ocorrendo no mundo e no Brasil têm resultado no aumento significativo do número de transplantes, embora estes ainda sejam insuficientes diante da enorme demanda de órgãos e tecidos do país.

Nos Estados Unidos da América (EUA) em 1944, se estabeleceu o primeiro banco de tecido ocular (BTO) do mundo, com o objetivo de garantir a qualidade da córnea doada. Fundou-se a Eye Bank Association of America - EBAA, em 1961, a fim de estabelecer normas técnicas para o funcionamento e certificação dos bancos de tecidos oculares. Anualmente, a EBAA divulga um relatório estatístico detalhado sobre os transplantes de córneas realizados nos Estados Unidos, com o objetivo de identificar os avanços, sucessos e reconhecer as falhas no processo de doação, captação e preservação. Os Estados Unidos são referência mundial em transplante de córnea. ⁽¹⁾

Dados da EBAA, demonstram que, em 2018 foram doados 133.576 córneas para transplante. Os Estados Unidos é o primeiro país do mundo em número absoluto de transplantes. No entanto, os transplantes são pagos pelos próprios pacientes de forma direta ou por meio de planos de saúde, exceto aqueles financiados por programas assistenciais do governo. ⁽¹⁾

No Brasil, a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO, fundada em 1987, tem por objetivo promover o desenvolvimento de atividades relacionadas a transplante de órgãos e tecidos. Anualmente, desde 1997, é divulgado pela ABTO, o Registro Brasileiro de Transplante – RBT com dados nacionais e regionais de todos os tipos de transplantes realizados no país, incluindo o transplante de córnea. ⁽²⁾

Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes – RBT, foram realizados 14.809 transplantes de córneas em 2018 no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul responsável pela realização de 617 transplantes, porém o Estado soma um total de 49 pacientes em lista de espera. ⁽²⁾ O Brasil é um dos países que mais possui programas de transplantes de órgãos e tecidos, tornando-se o segundo país no mundo em número de transplantes, ficando atrás somente dos Estados Unidos. ⁽³⁾

O Sistema Único de Saúde – SUS financia mais de 95% dos transplantes realizados no país e também custeia todos os medicamentos imunossupressores para os pacientes, ⁽³⁾ indicando que as políticas públicas contribuem para o acesso de inúmeros brasileiros a esta terapia.

Entre os transplantes realizados, o de córnea é o procedimento de transplante tecidual de grande sucesso em humanos e o mais realizado. Isto ocorre, devido ao crescimento do número de doadores, baixo índice de rejeição neste tipo de transplante e também porque há um aumento no número de Bancos de Tecidos Oculares Humanos – BTOC, também conhecidos como Banco de Olhos. ⁽⁴⁻⁵⁾

É evidente o crescimento no número de transplante de córnea realizados nos últimos anos, devido às novas técnicas operatórias, ampliação da faixa etária da população, à melhor seleção de tecido doador e à crescente conscientização da população. ⁽⁶⁾ Também cabe ressaltar que o transplante de córnea vem sendo um dos transplantes de maior sucesso no Brasil, principalmente devido ao seu menor risco de rejeição, por se tratar de um tecido avascular. ⁽⁷⁾

O procedimento de transplante de córnea consiste em substituir a porção debilitada da córnea de um paciente por uma córnea saudável, oriunda de um doador. Essa substituição pode ser pelo transplante penetrante (total) ou pode ser o transplante lamelar anterior ou lamelar posterior (parcial).⁽⁸⁾ Os procedimentos são agrupados dependendo da finalidade, finalidade óptica (melhorar a visão), transplante tectônicos (corrigir perfurações oculares), terapêuticos (tratamento de infecções não responsivas) ou ainda estético.⁽⁹⁾

O transplante de córnea também se sobressai pelo que representa na recuperação da visão de um indivíduo, uma vez que, as doenças da córnea correspondem à segunda causa de cegueira reversível no mundo e provocam uma importante perda fisiológica e social. O transplante de córnea ou ceratoplastia pode ter finalidades diagnósticas, terapêuticas ou tectônicas (corrigir perfurações oculares). Por essa razão, podemos perceber o quanto esta estrutura é importante para manter a visão de uma pessoa e o que este procedimento pode significar para o paciente. ⁽⁴⁻¹⁰⁾

Porém, os resultados dos transplantes de córneas estão intimamente relacionados à qualidade dos tecidos e dos processos nos Bancos de Olhos como captação, preservação, reavaliação e liberação destes tecidos. ⁽⁴⁻⁵⁾

Apesar dos grandes esforços dos Bancos de Tecidos Oculares Humanos para preservar a qualidade dos tecidos e de seus serviços, infecções pós transplante podem ocorrer, sendo por origem de contaminação pré-operatória, por condições assépticas inadequadas durante a manipulação da córnea ou por fatores do receptor. ⁽¹¹⁾

A captação da córnea é realizada após a seleção do doador. Existem duas formas para remoção das córneas, a remoção pode ser feita diretamente ou após a enucleação (retirada) do globo ocular, sendo a enucleação o procedimento mais utilizado pela facilidade, o que possibilita uma melhor avaliação do tecido doado. ⁽¹²⁾

Atualmente temos 53 Bancos de Olhos em funcionamento no Brasil. ⁽¹³⁾ Apesar dos meios de conservação apresentarem substâncias antimicrobianas na sua composição, trabalhos mostram a permanência de microrganismos resistentes como o *Staphylococcus aureus*, estreptococos, bacilos gram-negativos como a *Klebsiella* que podem ocasionar infecções pós transplante. Mesmo com esses dados, os Bancos de Olhos geralmente não realizam triagem microbiológica de seus doadores ou de seus processos.

Para que o transplante de córnea ocorra é preciso cumprir uma série de requisitos antes de ser liberado para o transplante. É preciso assegurar que o tecido doado está livre de contaminação microbiológica para evitar o risco de infecção pós-cirúrgica do receptor, especialmente a endoftalmite. ⁽¹⁴⁾

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar a presença de fungos leveduriformes em meios de preservação de córnea provenientes de Bancos de Tecidos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar o crescimento de leveduras presentes em líquidos de preservação de córnea;
- Identificar as possíveis espécies de fungos leveduriformes presentes em líquidos de preservação de córnea a partir da técnica MALDI-TOF.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS LEVEDURIFORMES EM MEIOS DE PRESERVAÇÃO PARA TRANSPLANTE DE CÓRNEA A PARTIR DA TÉCNICA DE *MALDI-TOF*

Taís Soares Martins, Fernando Pagnussato, Mercedes Passos Geimba

1.1 RESUMO

Os avanços científicos e tecnológicos que vem ocorrendo no mundo e no Brasil têm resultado no aumento significativo do número de transplantes, embora estes ainda sejam insuficientes diante da enorme demanda de órgãos e tecidos do país. Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes – RBT, foram realizados 14.809 transplantes de córneas em 2018 no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul responsável pela realização de 617 transplantes, porém o Estado soma um total de 49 pacientes em lista de espera. Atualmente temos 53 Bancos de Olhos em funcionamento no Brasil. Entre os transplantes realizados, o de córnea é o procedimento de transplante tecidual de grande sucesso em humanos e o mais realizado. O procedimento de transplante de córnea consiste em substituir a porção debilitada da córnea de um paciente por uma córnea saudável, oriunda de um doador. Apesar dos meios de conservação apresentarem substâncias antimicrobianas na sua composição, trabalhos mostram a permanência de microrganismos resistentes como o *Staphylococcus aureus*, estreptococos, bacilos gram-negativos como a *Klebsiella* que podem ocasionar infecções pós transplante. A introdução do meio de preservação de córneas de médio prazo no Brasil ocorreu há mais de dez anos. Dois meios vem sendo utilizados na preservação de córneas no país, o Optisol-GS® (Bausch e Lomb, EUA) e o Eusol-C® (Al.Chí.Itália). O método MALDI-TOF consiste em um sistema na qual o material biológico é colocado em uma placa em que há uma matriz polimérica. Com um laser, a amostra é irradiada onde há ionização de várias moléculas, que são aspiradas e levadas até o detector. A grande vantagem deste método é a identificação rápida e com o mínimo de preparo da amostra, o que leva a uma grande economia de tempo.

Palavras chave: Banco de tecidos. Transplante de córneas. Meios de preservação. *MALDI-TOF*. Endoftalmites.

2.2 INTRODUÇÃO

Os avanços científicos e tecnológicos que vem ocorrendo no mundo e no Brasil têm resultado no aumento significativo do número de transplantes, embora estes ainda sejam insuficientes diante da enorme demanda de órgãos e tecidos do país.

Nos Estados Unidos da América (EUA) em 1944, se estabeleceu o primeiro banco de tecido ocular (BTO) do mundo, com o objetivo de garantir a qualidade da córnea doada. Fundou-se a Eye Bank Association of America - EBAA, em 1961, a fim de estabelecer normas técnicas para o funcionamento e certificação dos bancos de tecidos oculares. Anualmente, a EBAA divulga um relatório estatístico detalhado sobre os transplantes de córneas realizados nos Estados Unidos. Os Estados Unidos são referência mundial em transplante de córnea. ⁽¹⁾

Dados da EBAA, demonstram que, em 2018 foram doados 133.576 córneas para transplante. Os Estados Unidos é o primeiro país do mundo em número absoluto de transplantes. No entanto, os transplantes são pagos pelos próprios pacientes de forma direta ou por meio de planos de saúde, exceto aqueles financiados por programas assistenciais do governo. ⁽¹⁾

No Brasil, a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO, fundada em 1987, tem por objetivo promover o desenvolvimento de atividades relacionadas a transplante de órgãos e tecidos. Anualmente, desde 1997, é divulgado pela ABTO, o Registro Brasileiro de Transplante – RBT com dados nacionais e regionais de todos os tipos de transplantes realizados no país, incluindo o transplante de córnea. ⁽²⁾

Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes – RBT, foram realizados 14.809 transplantes de córneas em 2018 no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul responsável pela realização de 617 transplantes, porém o Estado soma um total de 49 pacientes em lista de espera. ⁽²⁾ O Brasil é um dos países que mais possui programas de transplantes de órgãos e tecidos, tornando-se o segundo país no mundo em número de transplantes, ficando atrás somente dos Estados Unidos. ⁽³⁾

O Sistema Único de Saúde – SUS financia mais de 95% dos transplantes realizados no país e também custeia todos os medicamentos imunossupressores para os pacientes, ⁽³⁾

indicando que as políticas públicas contribuem para o acesso de inúmeros brasileiros a esta terapia.

Entre os transplantes realizados, o de córnea é o procedimento de transplante tecidual de grande sucesso em humanos e o mais realizado. Isto ocorre, devido ao crescimento do número de doadores, baixo índice de rejeição neste tipo de transplante e também porque há um aumento no número de Bancos de Tecidos Oculares Humanos – BTOC, também conhecidos como Banco de Olhos. ⁽⁴⁻⁵⁾

É evidente o crescimento no número de transplante de córnea realizados nos últimos anos, devido às novas técnicas operatórias, ampliação da faixa etária da população, à melhor seleção de tecido doador e à crescente conscientização da população.⁽⁶⁾ Também cabe ressaltar que o transplante de córnea vem sendo um dos transplantes de maior sucesso no Brasil, principalmente devido ao seu menor risco de rejeição, por se tratar de um tecido avascular.⁽⁷⁾

Essa substituição pode ser pelo transplante penetrante (total) ou pode ser o transplante lamelar anterior ou lamelar posterior (parcial).⁽⁸⁾ Os procedimentos são agrupados dependendo da finalidade, finalidade óptica (melhorar a visão), transplante tectônicos (corrigir perfurações oculares), terapêuticos (tratamento de infecções não responsivas) ou ainda estético.⁽⁹⁾

O transplante de córnea também se sobressai pelo que representa na recuperação da visão de um indivíduo, uma vez que, as doenças da córnea correspondem à segunda causa de cegueira reversível no mundo e provocam uma importante perda fisiológica, social e econômica. O transplante de córnea ou ceratoplastia pode ter finalidades diagnósticas, terapêuticas ou tectônicas. Por essa razão, podemos perceber o quanto esta estrutura é importante para manter a visão de uma pessoa e o que este procedimento pode significar para alguém que está na fila aguardando um transplante. ⁽⁴⁻¹⁰⁾

Porém, os resultados dos transplantes de córneas estão intimamente relacionados à qualidade dos tecidos e dos processos nos Bancos de Olhos como captação, preservação, reavaliação e liberação destes tecidos. ⁽⁴⁻⁵⁾

Apesar dos grandes esforços dos Bancos de Tecidos Oculares Humanos para preservar a qualidade dos tecidos e de seus serviços, infecções pós transplante podem ocorrer, sendo por

origem de contaminação pré-operatória, por condições assépticas inadequadas durante a manipulação da córnea ou por fatores do receptor. ⁽¹¹⁾

A captação da córnea é realizada após a seleção do doador. Existem duas formas para remoção das córneas, a remoção pode ser feita diretamente ou após a enucleação (retirada) do globo ocular, sendo a enucleação o procedimento mais utilizado pela facilidade, o que possibilita uma melhor avaliação do tecido doado. ⁽¹²⁾

Atualmente temos 53 Bancos de Olhos em funcionamento no Brasil.⁽¹³⁾ Apesar dos meios de conservação apresentarem substâncias antimicrobianas na sua composição, trabalhos mostram a permanência de microrganismos resistentes como o *Staphylococcus aureus*, estreptococos, bacilos gram-negativos como a *Klebsiella* que podem ocasionar infecções pós transplante. Mesmo com esses dados, os Bancos de Olhos geralmente não realizam triagem microbiológica de seus doadores ou de seus processos.

Para que o transplante de córnea ocorra é preciso cumprir uma série de requisitos antes de ser liberado para o transplante. É preciso assegurar que o tecido doado está livre de contaminação microbiológica para evitar o risco de infecção pós-cirúrgica do receptor, especialmente a endoftalmite. ⁽¹⁴⁾

2.3 MEIOS DE PRESERVAÇÃO DA CÓRNEA

A introdução do meio de preservação de córneas de médio prazo no Brasil ocorreu há mais de dez anos. Dois meios vem sendo utilizados na preservação de córneas no país, o Optisol-GS® (Bausch e Lomb, EUA) e o Eusol-C® (Al.Chí.Itália). O meio de preservação Eusol-C®, contém gentamicina como antimicrobiano e dextran como fator promotor de deturgescência do tecido. Meio Eusol-C® (Laboratórios Al. Chí. Mía, Itália) é composto de dextran, piruvato de sódio, glicose, aminoácidos essenciais e não-essenciais, sais minerais e vitaminas, gentamicina, HEPES, bicarbonato, vermelho fenol. Esses dois meios são para conservação a 4°C para períodos de até 14 dias. A conservação de córnea entre 2°C e 8°C é a mais utilizada no Brasil. Os dois meios permitem à córnea manter elevado metabolismo. Agora, já o meio de preservação Optisol-GS® (Bausch and Lomb, Irvine, CA, E.U.A.) é composto de sulfato de condroitina, dextran 40, base Optisol, bicarbonato de sódio, gentamicina, sulfato de estreptomicina, aminoácidos, piruvato de sódio, L-glutamina, 2-mercaptoetanol, água purificada. ⁽¹⁵⁾

A longa permanência da córnea nos meios de preservação indica sua pior qualidade e grande insucesso na preservação. Mesmo com os meios que possibilitam a preservação das córneas por até quatorze dias, estudos mostraram maior perda endotelial e morte do tecido quando se ultrapassa o período de sete dias. ⁽¹²⁾

2.4 ENDOFTALMITES

A endoftalmite constitui uma das complicações mais graves e de pior resultado funcional entre as afecções oftalmológicas, a infecção pode ser causada por contaminação pré-operatória do tampão cirúrgico, condições inadequadas de tratamento durante a cirurgia ou por fatores de risco. ⁽¹⁶⁾ Endoftalmite é o nome dado a infecção fúngica ou bacteriana no interior do olho, que envolve estruturas como os humores e/ou aquoso. Podem ser classificadas como endógenas ou exógenas. ⁽¹⁷⁾

A endoftalmite endógena é causada por microrganismos provenientes do próprio corpo e que foram disseminados pela corrente sanguínea até o olho. Os pacientes geralmente apresentam os sintomas de sua infecção sistêmica subjacente, às vezes podem apresentar apenas sintomas oculares. Os microrganismos envolvidos são o *Staphylococcus aureus*, estreptococos, Bacilos gram-negativos como a *Klebsiella*. ⁽¹⁸⁾ Ainda assim, a maioria dos casos de endoftalmite é do tipo exógenas, sendo causadas por microrganismos oriundos do ambiente externo. Sendo as principais causas da penetração desses microrganismos no interior do olho: os traumas, córnea previamente infectada ou cirurgia prévia. Os principais microrganismos envolvidos são *Bacillus cereus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Propionibacterium acnes* e os fungos como a *Candida* spp. em especial a *Candida albicans*. ⁽¹⁷⁾

Os fungos normalmente não penetram na córnea íntegra e apesar da presença de muitos saprófitas compondo a microbiota conjuntival normal, existe a necessidade da ruptura do epitélio corneano para que ocorra a penetração dos mesmos. A virulência do fungo é devido a sua capacidade de resistir às defesas do hospedeiro e de penetrar através da membrana íntegra, atingindo a câmara anterior. Podendo ainda causar necrose tecidual através da produção de enzima. ⁽¹⁹⁾

Estudos revelam que a infecção oftalmológica após o transplante de córnea indicam que o risco de transmissão microbiana do doador para o receptor é infinitamente maior quando há cultura positiva da borda do doador. ⁽²⁰⁾

Quando se observa sinais de endoftalmite logo após o transplante, os pacientes precisam ser tratados imediatamente para os microrganismos específicos afim de combater a contaminação microbiana. ⁽¹⁶⁾

No momento do transplante de córnea, a borda corneoesclerótica (residual) pode ser submetida à cultura, principalmente como um marcador de contaminação em qualquer etapa durante o processamento prévio pelo Banco de Olhos. É característica da endoftalmite ocorrer de forma rápida dentro de 48 horas à 72 horas logo após transplante.

2.5 MÉTODO CLÁSSICO DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES

Existem técnicas convencionais de cultivo e isolamento de microrganismos que são comumente empregadas. Os métodos clássicos para identificação de microrganismos se baseiam em características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Para cada microrganismo existem testes bioquímicos e fisiológicos para identificação. ⁽²¹⁻²²⁾ O cultivo de forma geral é a técnica mais utilizada para realizar a leitura microbiológica, é uma técnica simples que permite identificação de microrganismos. A desvantagem que alguns microrganismos podem não estar viáveis e não cultiváveis o que acaba ocorrendo é um problema na interpretação do teste.

A identificação de leveduras isoladas de espécimes clínicos para o nível de espécie tem se tornado cada vez mais importante. Uma ampla gama de patógenos reconhecidos e a descoberta de resistência a drogas antifúngicas são fatores que contribuem para essa necessidade. ⁽²³⁾ O meio CHROMagar Candida pode identificar espécie de *Candida* com base na cor e morfologia coloniais. A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação destas leveduras, fornecendo resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados. ⁽²⁴⁾ O meio Sabouraud Dextrose (ASD) é utilizado para cultivo de fungos patogênicos e comensais e leveduras. A alta concentração de dextrose pH ácido da fórmula deste ágar permitem a seletividade dos fungos, utilizado para diagnóstico de infecções causadas por fungos. Como princípio temos a digestão enzimática de caseína e

digestão enzimática de tecido animal fornecem nitrogênio e vitaminas necessárias para o crescimento do organismo no ágar. A dextrose serve como fonte de energia. ⁽²⁵⁾

Os métodos convencionais de identificação de leveduras consistem principalmente em características de assimilação e fermentação. A identificação de leveduras requer avaliação da morfologia microscópica e dos estudos bioquímicos. ⁽²³⁾

2.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR MALDI-TOF

A sigla significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight* e consiste em um sistema na qual o material biológico é colocado em uma placa em que há uma matriz polimérica. Com um laser, a amostra é irradiada onde há ionização de várias moléculas, que são aspiradas e levadas até o detector. Conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time off light*) é diferente. Através de um gráfico que gera diferentes picos para cada espécie bacteriana e fúngica, obtém-se um gráfico específico. Estes dados obtidos são comparados a uma base de dados computadorizada que interpreta e fornece o resultado de forma rápida. ⁽²⁶⁾

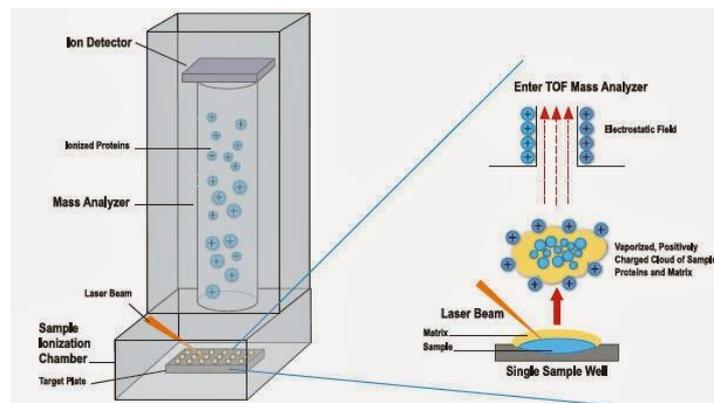


Figura 1: MALDI-TOF: como ocorre a espectrofotometria no aparelho

A grande vantagem deste método é a identificação rápida e com o mínimo de preparo da amostra, o que leva a uma grande economia de tempo. O diagnóstico rápido e preciso de patógenos é primordial para o tratamento adequado. Com o aumento do uso da técnica os bancos de dados ficaram mais completos e a identificação mais acurada. ⁽²⁷⁾

2.7 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DEMIP) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Com amostras cedidas da Unidade de Multitecidos (UBMT) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os 11 isolados de fungos foram identificados presuntivamente a partir de 136 botões córneosclerais conforme projeto de pesquisa N° 16-0334, aprovado na Plataforma Brasil sob o CAAE 57465416.0.0000.5327 (Pagnussato, F.; Marinho, D. R.; Geimba, P. G., 2016).

O isolamento das culturas fúngicas foi observado após a incubação de 0,1 mL do meio de conservação precipitado no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose – ASD (Merk, Darmstadt, Germany), as placas foram incubadas à 37°C por 24 a 72 horas. No prazo de 1 a 3 dias foi identificado macroscopicamente o crescimento de colônias com características e morfologia de compatibilidade com os aspectos leveduriformes.

As colônias isoladas a partir do meio ágar Sabouraud dextrose foram então subcultivadas no meio CHROMagarTM Candida (BD, Sparks, USA) e incubadas à 37°C por 48 horas. A morfologia apenas das colônias pigmentadas foram consideradas na leitura e na interpretação dos resultados. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

Após o período de incubação e identificação macroscópicas das colônias, foi realizado a preparação das amostras para a técnica de MALDI-TOF. As técnicas utilizadas foram: transferência direta e pelo método de extração com etanol absoluto.

Para fazer a leitura por transferência direta uma colônia fúngica selecionada foi aplicada em um spot de uma placa de aço inoxidável, onde após secagem foi adicionado sobre a amostra 1µl de matriz. Pela técnica de extração, uma colônia fúngica foi adicionada a 300µl de água milli-Q. Após esta etapa foi adicionado 900µl de etanol absoluto. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 50µl de ácido fórmico 70% e homogeneizado em vórtex. Após foi adicionado 50µl de acetonitrila. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos e 1µl do sobrenadante de cada amostra foi pipetado em triplicada em uma placa de aço inoxidável deixando secar em temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado 1µl de matriz sobre a amostra e deixado secar em temperatura ambiente para realização da leitura no equipamento. A placa carregada foi então inserida no Equipamento Bruker, Microplex Biotyper, no

software MALDI Biotyper 4.0, os espectros foram analisados por padrão de correspondência com uma configuração padrão.

Tabela 1: Níveis de confiança atribuídos à identificação a partir de uma correlação dos scores dos espectros obtidos de uma bactéria de interesse com os do banco de dados do MALDI-TOF Microflex Biotyper.

Scores	Descrição	Símbolo
2.300 – 3.000	Identificação segura a nível de espécie	+++
2.000 – 2.299	Identificação segura a nível de gênero Provável identificação a nível de espécie	++
1.700 – 1.999	Provável identificação a nível de gênero	+
0 – 1.699	Nível de confiança insuficiente para identificação	-

Figura 2: Score de identificação obtidos em banco de dados do MALDI-TOF

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 11 isolados de fungos, foram observados em sua maioria espécies de *Candida Sp.* (Tabela 1). Na análise macroscópica se verificou a presença de colônias de coloração clara, cremosa e brilhantes. Evidências essas que foram compatíveis com a morfologia leveduriformes.

Das 11 culturas positivas no meio ágar Sabouraud dextrose, após subcultivo em CHROMagar *Candida*TM foram identificados presuntivamente 04 cepas de *Candida albicans*, 02 cepas de *Candida guilhermondii*, 01 cepa de *Candida lusitanae*, 01 cepa de *Candida parapsilosis* e 02 cepas de *Trichosporum montevideense*.

Todos os isolados de leveduras foram identificados pelo método de MALDI-TOF. Dentre os isolados foi observado bons padrões de correspondência, com alto nível de pontuação indicando a nível de espécie.

O método de MALDI-TOF vem se mostrando vantajoso, proporcionando uma maior agilidade na identificação de microrganismos o que permite diagnósticos microbiológicos mais complexos. ⁽²⁸⁾

Tabela 1. Identificação de espécie de fungos leveduriformes utilizando a técnica de MALDI-TOF.

Identificação	Lateralidade	Organismo	Valor da pontuação
5	E	<i>Candida albicans</i>	1.835
15	E	<i>Candida albicans</i>	2.084
28	E	<i>Candida lusitaniae</i>	2.099
52	D	<i>Candida guilliermondii</i>	2.276
59	D	<i>Candida albicans</i>	2.004
62	D	<i>Trichosporum montevideense</i>	2.056
63	E	<i>Candida guilliermondii</i>	2.135
64	D	<i>Candida parapsilosis</i>	1.862
64	E	<i>Trichosporum montevideense</i>	2.054
74	D	<i>Candida guilliermondii</i>	2.402
83	D	<i>Candida albicans</i>	2.197

Neste estudo houve predomínio do gênero *Candida*, principalmente a espécie de *Candida albicans*. A presença de *Candida* na maioria dos resultados já é bem relatado por outros autores (LINKE et al., 2013; KHOUANI et al., 2014). Já os autores Cameron et al. 1991; Merchant et al. 2001 e Garg et al. 2013 atribuíram a contaminação do doador a infecção ocular causada por *Candida albicans* após o transplante de córnea. ⁽²⁹⁻¹⁸⁻³⁵⁻³⁶⁻³⁷⁾

Khouani et al. (2014) relatou que em seu estudo os dois microrganismos mais frequentes responsáveis pelas contaminações dos transplantes são espécies de *Staphylococcus* que foram os microrganismos mais predominantes, representando 62,3% das bactérias isoladas e as espécies de *Candidas* foram as mais comuns entre os fungos com 76,9% dos microrganismos fúngicos totais.⁽¹⁸⁾ O que ocorreu com Linke et al. (2013) que encontrou 45% de espécie de *Candida* e 12,8% da espécie de *Staphylococcus* em sua pesquisa.⁽²⁹⁾

Os microrganismos mais comuns relatados em estudos anteriores são de espécies de *Candida* e espécie de *Staphylococcus* (Patel et al. 2005; Hermel et al. 2010), que pertencem a flora microbiana normal da pele.⁽³⁰⁻³¹⁾ Os relatos de Gruenert et al. (2017) que as contaminações causadas por fungos são de 48,9% e bactérias de 73,5% (bactéria gram-negativa) e 26,5% (bactéria gram-positiva).⁽³²⁾ Em concordância com outros estudos, *Candida* e *Staphylococcus* foram frequentemente isolados (Patel et al. 2005; Linke et al. 2013; Khouani et al. 2014; Gruenert et al. 2017).⁽³⁰⁻²⁹⁻¹⁸⁻³²⁾ No entanto, a composição difere entre os estudos. Enquanto Linke et al. (2013) encontram fungos com 62% das contaminações, Gruenert et al. (2017) encontrou fungos em 38% dos seus isolados com contaminação.⁽²⁹⁻³²⁾

Conforme Aldave et al. (2013) em seu estudo as espécies de *Candida* foram os únicos fungos identificados nas culturas de doadores e receptores, sendo as espécies mais comuns a *Candida albicans* com 45%, seguido por *Candida glabrata* 35%, *Candida glabrata e Candida tropicalis* 6% e *Candida dubliniensis* com 3% dos isolados.⁽³³⁾

Foi discutido por Linke et al. (2013) que para reduzir o número de contaminações fúngicas, a suplementação de anfotericina B fresca ao meio de cultura seria uma alternativa a redução de crescimento fúngico.⁽²⁹⁾

Ritterband et al. (2007) também discutiu sobre a relação da suplementação antifúngica do meio de armazenamento de córnea, mostram que a suplementação de Optisol-GS com voriconazol (100mg/mL) reduz a taxa de culturas com resultados positivos de bordas de fungos. Estudos da estabilidade do voriconazol adicionado ao Optisol-GS mostrarem que o crescimento fúngico foi suprimido entre seis à sete dias, indicando que o voriconazol deve ser adicionado ao meio de armazenamento no momento da captação da córnea. Mesmo com testes realizados demonstrarem que a suplementação de Optisol-GS com voriconazol (100mg/mL) não produziu diminuição da viabilidade celular endotelial.⁽³⁴⁾

Nosso trabalho mostrou que o predomínio de isolados serem do gênero *Candida* corrobora com vários outros estudos, fato relacionado principalmente com a origem dos isolados. Quanto a suplementação antifúngica adicionada ao meio de preservação no momento da captação da córnea seria uma nova alternativa no controle de crescimento fúngico sendo necessário mais estudos e elaboração de protocolos para aumentar a eficiência na descontaminação.

3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A taxa de contaminação por fungos em córneas conservadas por Bancos de Tecidos Oculares humanos já é conhecida e por vários relatos da literatura.

O método MALDI-TOF se mostrou bastante eficaz na identificação das colônias fúngicas e útil para resultados rápidos e confirmatórios.

No Brasil, não há padronização de protocolos quanto ao tempo de exposição da córnea no líquido de preservação. Como também, não é exigido pelas regulamentações atuais.

A ausência na divulgação de dados dificulta o conhecimento das atuais necessidades das regiões do Brasil. A falta de informações sobre pacientes pós-transplante e o sucesso do procedimento dificulta a análise de dados para acompanhamento das infecções pós-transplante.

Outros estudos devem ser conduzidos para que se possa acompanhar as infecções pós-transplante e utilizar-se destas informações para aumentar a eficácia dos transplantes e contribuir para que ocorra uma padronização de protocolos para diminuir o descarte das córneas e aumentar a eficiência dos transplantes.

REFERÊNCIAS

1. Eye Bank Association of America. Statistics. 2018. [internet]. Disponível em: <http://restoresight.org/who-we-are/statistics/> Acesso em: 20.05.2019.
2. Registro Brasileiro de Transplante veínculo oficial da Associação Brasileira de Transplante de Orgãos http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/Lv_RBT-2018.pdf. Acesso em: 10.04.2019
3. Reis, D. J. F. et al. Doação e transplantes de órgãos no Brasil: filas de espera e famílias. Revista mineira de educação física, Viçosa, n. 5, p. 96-104, 2010. Edição especial.
4. Chalita, M. R. C. et al. Rejeição corneana pós transplante de córnea: análise de dados do Banco de Olhos do Hospital São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Arquivos brasileiros de oftalmologia, São Paulo, v. 63, n.1, p. 55-58, jan./fev. 2000.
5. Sano, R.Y. et al. Análise das córneas do Banco de Olhos da Santa Casa de São Paulo utilizadas em transplantes. Arquivos brasileiros de oftalmologia, São Paulo, v.73, n.3, p-254-258, jun.2010.
6. Neves, R. C.; Boteon, J. E.; Santiago, A. P. M. S. Indicações no transplante de córnea no Hospital São Geraldo da Universidade Federal de Minas Gerais. Revista brasileira de oftalmologia, Rio de Janeiro, v.69, n.2, p. 84-88, mar./abr. 2010.
7. Silva, A. F.; Guimarães, T. S.; Nogueira, G. P. A atuação do enfermeira na captação de órgãos. Revista brasileira de ciências da saúde, São Caetano do Sul, v.7, n.19, p.71-85, 2009.
8. Moreira, H. et al. Banco de olhos, transplante de córnea. 1ª edição. Brasil: Cultura Médica, 2008.
9. Holland, E. J. et al. Doenças da Superfície Ocular: Córnea, Conjuntiva e Filme Lacrimal. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
10. Adan, C. B. D. et al. Dez anos de doação de córneas no Banco de Olhos do Hospital São Paulo: perfil dos doadores de 1996 a 2005. Arquivos brasileiros de oftalmologia, São Paulo, v. 71, n.2, p. 176-181, mar./abr. 2008.
11. Thomassen H. et al. Evaluation of a new protocol for sterility controls of corneal culture médium. Cell tissue bank. 16(3):343-50, 2015.
12. Garcia V. D. et al. Transplante de órgãos e tecidos. 2ªed. São Paulo: Segmento Farma, 2006
13. Registro Brasileiro de Transplante veínculo oficial da Associação Brasileira de Transplante de Orgãos <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2019/RBT-2019-1%20trim%20-%20Pop.pdf>. Acesso em: 01.06.2019.
14. Schroeter J. et al. Procedural guidelines. Good tissue practice for cornea banks. Ophthalmologie 106 (265-274):276, 2009.
15. Casanova F. Neves R. A. Seus olhos: cuidados e informações básicas para sua saúde ocular. 1ªed. São Paulo: CLA, p. 124, 2004.
16. Rehany U, Balut G, Lefler E & Rumelt S. The prevalence and risk factors for donor corneal button contamination and its association with ocular infection after transplantation. Cornea 23: 649-654, 2004.
17. Durand, M. L. Endophtalmitis. Clin Microbiol Infect, v.19, n.13, p. 227-234, 2013.
18. Khouani M. et al. Evaluation of microbial contamination of corneal transplants: One-year report from a french regional eye bank. Evaluation of microbiol. Contamination. v.33, n.9, p.899-904, sep. 2014.

19. O'Day D. M., Burd E. M. Fungal Keratitis and Conjunctivitis. Mycology. In: Smolin G, Thoft R. A. The Cornea. Boston: Little, Brown, p.229-39, 1994.
20. Hassan S. et al. Eye-banking Risk Factors for Fungal Endophthalmitis Compared With Bacterial Endophthalmitis After Corneal Transplantation. American Journal of Ophthalmology, v.139, n.4, p. 685-690, 2005.
21. Krieg N. R, Holt J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp. 1395, 1986.
22. MacFaddin J. F. Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria. Williams & Wilkins company. Baltimore, USA. 480p. 2000.
23. Carrillo-Munõz A. J, Quindós G. et al. Evolución del medio chromoalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. Rev. Iberoam Micol 18: 501-108, 2001.
24. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presuntive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. J Clin Microbiol 36: 1157-1159, 1998.
25. Recomendação do fabricante, ágar sabouraud dextrose https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7150_pt_pi.pdf.
26. Kato T. O, Yamamoto N. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. PLoS One. 11(7):e0159730. 2016.
27. Pasternak, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. Eistein (São Paulo). 10 (1): 118-9, 2012.
28. Wolff, L. T. Utilização da tecnologia maldi-tof MS na microbiologia clínica. Rev. Uniplac, v.6, n.1, 2018.
29. Linke S. J. et al. Risk factors for donor cornea contamination: retrospective analysis of 4546 procured corneas in a single eye bank. Cornea. 32:141-148, 2013.
30. Patel H. Y. et al. The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: a review of the source and management of corneal tissue. Cornea 24: 576-582, 2005.
31. Hermel M. et al. Detection of Contamination During Organ Culture of the Human Cornea. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 248:117-126, 2010.
32. Gruenert A. K. et al. The influence of donor factors on corneal organ culture contamination. Acta Ophthalmologica. John wiley & Sons Ltd. Germany. p.1-8, 2017.
33. Aldave A. J. et al. Report of the Eye Bank Association of America Medical Advisory Board Subcommittee on Fungal Infection After Corneal Transplantation. v.32, n.2, p.149-154, fev. 2013.
34. Ritterband D. C. et al. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: a preservation medium for corneal donor tissue. Cornea. 26: 343-347, 2007.
35. Cameron, J. A. et al. Endophthalmitis from contaminated donor corneas following penetrating keratoplasty. Arch Ophthalmol, v.109, n.1, p.54-59, 1991.
36. Merchant, A. et al. Candidal endophthalmitis after keratoplasty. Cornea, v.20, n.2, p. 226-229, 2001.
37. Garg, S. et al. Prevalence of positive microbiology results from donor cornea tissue in diferente methods of corneal transplantation. Cornea, v.32, n.2, p. 137-140, 2013.

**ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA
SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS**



RBAC. 2016;48(1):85-8 85

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

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 anuscrito 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* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínicolaboratoriais 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 [SRCTN], 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 pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, 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 pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente 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. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

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/abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (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/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/keywords (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. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: 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. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (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.

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS
Brazilian Journal of Clinical Analysis
 ISSN - Versão Online
 ISSN 0370-369-x – Versão Impressa
INSTRUÇÕES AOS AUTORES
 86 RBAC. 2016;48(1):85-8

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais 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/ abstract 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.

NOTA TÉCNICA: Descrição/ validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/ *abstract*.

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 técnico-científicos 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 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 normalização técnica conforme o quadro abaixo.

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-CHAVE: 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], laborado 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. 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 Instruções aos autores/*Instructions for authors* RBAC. 2016;48(1):85-8 87 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. 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", ".docx" 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 serão 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 Biomédica] 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 (Versão em Português) ou em 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 das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética.** 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 parênteses. 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.”;
- 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 apóstrofes 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.(14)

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: livre-docência, 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.
- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra 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. Paracoccidiodomycosis. *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, et al. *Cryptococcus neoformans*-Instruções aos autores/*Instructions for authors* 88 RBAC. 2016;48(1):85-8 *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, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated 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;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; 19(4 Suppl):4-15.
- **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int*. 2012;61(3):351-2.
- **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger*. 2012;174(42):2518.
- **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics*. 2012;12(19-20):2902-3.
- **Carta ao editor:** Dettkenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;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 Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

- **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.

- **Reponsabilidade 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 5º 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, et al. 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: 4o. Congreso Virtual de Micología de Hongos Patógenos em 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. 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 e-mail, 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 pós-graduação 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.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC* para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC.

Declaramos também que o

artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores.

Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/____/____.

Instruções aos autores/*Instructions for authors*