

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Identificação de Amebas de Vida Livre em Aparelhos Condicionadores de ar de um Hospital  
Público no município de Ituiutaba, MG.

João Diogo Garcia da Fonseca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Identificação de Amebas de Vida Livre em Aparelhos Condicionadores de ar de um Hospital  
Público no município de Ituiutaba, MG.

Joao Diogo Garcia da Fonseca

Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2018

## RESUMO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários com capacidade de habitar de maneira cosmopolita a água doce e podem ser patógenos oportunistas com grande relevância para a Saúde Pública, sendo os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* os mais importantes por acometer principalmente indivíduos imunossuprimidos. Avaliou-se a presença destes microrganismos em um hospital público de Ituiutaba, MG, utilizando poeira de ar-condicionado do Centro Cirúrgico (CC) e da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). Foram colhidas 48 amostras sendo 32 (66%) do CC e 16 (34%) da UTI. Destas foram consideradas positivas 10,4% (5/32) de amostras do CC e, 75% (12/16) da UTI. A análise molecular mostrou que 6,25% (2/32) das amostras do CC foram identificadas como *Acanthamoeba* e 3,2% (1/32) como *Balamuthia*. Nas Amostras da UTI 50% (8/16) continham material genético de *Acanthamoeba* e 43,7% (7/16) de *Balamuthia*. Através da técnica do sequenciamento foram identificados os genótipos de *Acanthamoeba* T3 e T4. Este trabalho mostra a ampla distribuição de isolados de *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia* ssp. em aparelhos condicionadores de ar e sugere-se que estes microrganismos sejam importantes fontes de infecção, por atuarem como reservatórios de bactérias patogênicas.

**Palavras-chave:** *Acanthamoeba*; *Balamuthia*; hospital; ar-condicionado.

## SUMÁRIO

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Principais Espécies de Amebas de Vida Livre.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. <i>Acanthamoeba</i> sp .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. <i>Naegleria</i> sp.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4. <i>Balamuthia mandrillaris</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Geral .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Específicos .....</b>	<b>9</b>
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>10</b>
<b>4. ARTIGO.....</b>	<b>20</b>
<b>5. ANEXO-NORMAS REVISTA SAÚDE PÚBLICA .....</b>	<b>43</b>

## 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As amebas compõem um amplo grupo de protozoários que se locomovem através do movimento amebóide, utilizando prolongamentos citoplasmáticos chamados de pseudópodes (ROCHA-AZEVEDO, 2008). Além da locomoção, os pseudópodes são responsáveis pela captura de alimentos, que são envolvidos pelos mesmos e internalizados em vacúolos digestivos dentro do citoplasma (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

As amebas de vida livre (AVL) são encontradas nos mais diversos habitats pelo mundo, tanto no solo quanto na água, podendo se alimentar de bactérias, leveduras e outros organismos. Não são parasitas obrigatórios e podem completar seu ciclo de vida sem a participação de um hospedeiro (ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009).

Esses protozoários são muitas vezes denominados como anfizóicos, por apresentarem capacidade de viver dentro de um organismo como parasitas ou no ambiente de forma livre (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). Por meio desse comportamento dualista, esses organismos podem causar doenças em humanos e animais, sendo os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* os principais agentes etiológicos conhecidos das encefalites e ceratites humanas causadas por amebas. Deste modo, o achado de AVL potencialmente patogênicas em amostras ambientais de locais com frequente circulação de pessoas, como os hospitais, é de grande importância para a determinação de riscos como possíveis fontes de infecções aos seres humanos (CARLESSO et al., 2007).

As AVL podem ser encontradas no ar, lagos, solo (adubado ou não), rios, piscinas (são resistentes ao cloro, desinfetantes, temperaturas extremas e pH), poeira, hospitais, lentes de contato e águas de torneiras, demonstrando a natureza onipresente desses organismos (CROZETTA, 2007). Apresentam ampla distribuição geográfica, sendo facilmente isolados

em todos os continentes, principalmente os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* (ALVES, 2012; CALIXTO et al., 2014). O gênero *Balamuthia* é encontrado no solo, tem comportamento pouco conhecido, é de difícil isolamento e possui uma lenta taxa de crescimento *in vitro*, ao contrário do gênero *Acanthamoeba* (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

O contato com estes protozoários, através de fissuras na pele ou córnea e a aspiração e/ou inalação de água contaminada ou ar pelo trato respiratório superior é a porta de entrada para as infecções (ALVES, 2012; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). Cermeño et al. (2006), apontam que nas últimas quatro décadas 200 casos de infecção por *Acanthamoeba* foram descritos por todo o mundo, além de 100 casos por *Balamuthia* e 200 casos por *Naegleria*.

De forma geral, um ar-condicionado funciona sugando o ar quente do cômodo com um ventilador, em seguida o ar passa por uma evaporadora e entra em contato com um fluido refrigerante, onde se torna frio e é devolvido ao cômodo (RIBEIRO, 2013). Antes de ser devolvido ao cômodo o ar é filtrado, nesse momento a poeira é retida no filtro juntamente com outros detritos, inclusive cistos e trofozoítos de AVL.

Em trabalho realizado a partir de amostras de ar-condicionado do Hospital Universitário de Florianópolis, SC, foram analisadas 54 amostras, sendo 41 (75,9 %) positivas para AVL (MACEDO et al., 2015). O clima tropical do Brasil, geralmente quente durante todo o ano, estimula o uso de condicionadores de ar. Isso pode aumentar o risco de exposição a cistos e/ou trofozoítos de AVL presentes no ar, principalmente em ambientes hospitalares e locais fechados com grande aglomeração de pessoas.

## 1.1. Principais Espécies de Amebas de Vida Livre

### 1.1.2. *Acanthamoeba* sp

As espécies do gênero *Acanthamoeba* possuem dois estágios durante o seu ciclo biológico, o trofozoíto, forma vegetativa e o cisto, sua forma resistente. Os trofozoítos, com diâmetro de 13.5-22.5  $\mu\text{m}$ , têm pseudópodes característicos, projeções espinhosas chamadas de acantopódios (KHAN, 2006). Possuem um vacúolo contrátil para o controle de água no citoplasma e um núcleo com grande nucléolo, apesar de serem também encontradas células multinucleadas em cultura (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Os trofozoítos se alimentam de leveduras, bactérias, algas e partículas orgânicas, processo que pode ser visualizado através dos vacúolos digestivos no citoplasma (KHAN, 2006).

Os cistos (8-29  $\mu\text{m}$ ) de *Acanthamoeba* sp. são uninucleados com camada externa irregular contendo poros, chamados de ostíolos, também apresentam parede dupla, conferindo resistência a condições adversas, incluindo temperatura, pH, salinidade, osmolaridade e ao uso de desinfetantes em concentrações elevadas (CALIXTO et al., 2014; PACHECO; MARTINS, 2008). Em ambientes úmidos e com disponibilidade de substrato, como bactérias, acontece o desencistamento seguido de multiplicação dos trofozoítos por fissão binária (NEVES, 2004).

Algumas das principais espécies de *Acanthamoeba* conhecidas são, *A. culbertsoni*, *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. royreba*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. rhysodes*, *A. palestinenses* (CIMERMAN; CIMERMAN, 2008). Segundo Pussard e Pons (1977) as espécies do gênero *Acanthamoeba* são divididas em três grupos, I, II e III, de acordo com a morfologia dos cistos.

Algumas espécies de *Acanthamoeba*, exceto a responsável pela ceratite, podem causar a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), sendo a provável porta de entrada as mucosas. É uma doença neurológica grave, crônica, de progressão lenta, que gera granulomas na área afetada e pode ser fatal em semanas ou meses (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Nos últimos anos, a espécie *A. polyphaga* tem sido isolada de pacientes com ulceração da córnea e trabalhos apontam para patogenia em camundongos por via nasal (REY, 2008). A invasão por fissuras e traumas na córnea é reconhecida como a porta de entrada dos protozoários, causando as ceratites por *Acanthamoeba*. O constante uso de lentes de contato pode contribuir para infecção por AVL devido a irritação ocasionada pela aderência com posterior desenvolvimento da ceratite que evolui de forma rápida, com ulceração da córnea, esclerite, irite, dor e perda de visão (CIMERMAN; CIMERMAN, 2008).

Como todas as espécies de amebas de vida livre a *Acanthamoeba* já foi isolada de praticamente todos os habitats, com caráter ubíquo e cosmopolita, sendo provavelmente as AVL mais abundantes na natureza (POSSAMAI, 2012). São encontrados em solo, água, vegetais, hospitais, esgotos, áreas de ventilação (REZAEIAN et al., 2008), águas minerais engarrafadas (SALAZAR; MOURA; RAMOS, 1982), resíduos de esgoto (SAWYER, 1989) e vários outros locais naturais e/ou urbanos. Já foram isolados de tecidos celulares de animais e humanos, tanto assintomáticos como em indivíduos apresentando manifestações clínicas específicas, além de serem também encontrados como contaminantes em culturas de bactérias, leveduras e mamíferos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; POSSAMAI, 2012).

A utilização de novas ferramentas como a biologia molecular do DNA ribossomal 18S, permitiu obter uma classificação mais fidedigna do gênero *Acanthamoeba*, sendo possível a identificação de 20 genótipos (T1 – T20), a metade destes genótipos (T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11, T15, T18 e T20) já foram relatados gerando infecção em humanos onde o



genótipo T4 foi o mais abundante. É importante mencionar que a classificação por genótipos não está associada com a espécie. (FUERST, et al. 2015).

### 1.1.3. *Naegleria* sp

As amebas do gênero *Naegleria* possuem três estágios de vida, o trofozoíto (10-25  $\mu\text{m}$ ), forma ameboide responsável pela alimentação e reprodução, uma forma flagelada (10-16  $\mu\text{m}$ ), característica de algumas espécies do gênero e o cisto (7-12  $\mu\text{m}$ ), que oferece proteção contra condições adversas (MARCIANO-CABRAL, 1988; ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

Os trofozoítos de *Naegleria* sp. apresentam corpo cilíndrico, apenas um núcleo, um pseudópode arredondado do tipo lobópode, 1-6 vacúolos pulsáteis e comportamento bastante ativo, constantemente mudando de forma e tamanho (BARON, 1996; REY, 2008). O núcleo celular possui um grande nucléolo central com ribonucleoproteínas e pouco DNA periférico (KILVINGTON; MANN; WARHURST, 1991).

A forma flagelada possui dois flagelos de aparecimento rápido que se movimentam de forma livre na água e provavelmente são responsáveis pela dispersão do organismo (SIQUEIRA-BATISTA, 2007). A transformação de trofozoíto para a forma flagelada pode ser induzida *in vitro* através da exposição a água destilada e apresenta duração de 30 a 60 minutos contribuindo para o diagnóstico da infecção (ALVES, 2006; BARON, 1996; CIMERMAN; CIMERMAN, 2008). Dingle e Fulton (1966) demonstraram experimentalmente uma associação íntima dos flagelos, corpos basais, rizoblastos e núcleo, formando o aparelho flagelar destas amebas.

Os cistos protegem o organismo contra a dessecação e escassez de alimento, apresentam paredes diferentes de acordo com a espécie. Em *N. gruberi*, por exemplo, o cisto

exibe uma dupla parede composta por mucopolissacarídeos, de forma que em *N. fowleri* e *N. jadini* essa camada cística é ausente (TEIXEIRA, 2008). As formas císticas são geralmente esféricas e de parede dupla, com um endocisto espesso, seguido de um ectocisto estreito e bem próximo, possui poros, mas são de difícil visualização em microscopia de luz (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Os cistos com potencial patogênico se tornam rapidamente inviáveis quando se encontram desidratados, a perda de água no citoplasma leva à desnaturação das proteínas (BIDDICK; ROGERS; BROWN, 1984).

Atualmente a espécie *N. fowleri* é reconhecida como a maior responsável pela meningoencefalite amebiana primária (PAM), apesar de outras espécies com potencial patogênico terem sido descritas, como *Naegleria australiensis* e *Naegleria italica* (SCHUSTER, 2002). Existem mais de doze espécies de *Naegleria* reconhecidas por análises moleculares, DNA da subunidade menor do ribossomo (SSU rDNA) sendo algumas espécies como *N. jadini*, *N. lovaniensis*, *N. andersoni* e *N. gruberi*, comumente encontradas no ambiente, mas não apresentam patogenicidade (CIMERMAN; CIMERMAN, 2008; SCHUSTER, 2002). Um estudo de isolamento e genotipagem realizado por Edagawa et al. (2009) em águas de torneiras em Osaka, Japão, revelou a presença de 18 espécies e linhagens diferentes de *Naegleria*, com as mais comumente identificadas sendo *N. thihangensis*, *N. australiensis* e *N. pagei*.

A espécie *N. fowleri* é termofílica e sua presença em águas para recreação como piscinas e fontes termais naturais, está relacionada as infecções (KEMBLE et al., 2012). Apenas a espécie *N. fowleri* foi isolada de humanos, sendo a responsável pela meningoencefalite amebiana primária (MAP), doença rara que atinge o sistema nervoso central, possuindo progressão rápida e letalidade (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2007).

A MAP é uma infecção não-oportunista que pode acometer crianças saudáveis e adultos jovens, a maioria com histórico de contato com coleções de água para recreação.

Alguns estudos mostraram que a infecção acontece por via olfativa devido a contaminação da nasofaringe com águas contendo o protozoário (ALVES, 2006; REY, 2008). Os sintomas são súbitos e, incluem cefaleia, febre, rinite e dor de cabeça e podem se agravar depois de três dias, com o surgimento de vômito, rigidez na nuca e posterior coma (REY, 2008).

De acordo com trabalho de Cogo et al. (2004), um garoto de nove anos apresentando febre (38°C), contagem de leucócitos de 13.780/mm<sup>3</sup>, líquido cefalorraquidiano (LCR) turvo com presença de leucócitos, entre outros sintomas, deu entrada em um hospital de Este, na região de Veneto na Itália. No segundo dia de internação exibia rigidez no pescoço e sonolência, após 6 dias de aparecimento dos primeiros sintomas o paciente evoluiu para óbito em decorrência do acometimento do sistema nervoso central grave e posteriormente foi confirmada a infecção por *N. fowleri*.

#### **1.1.4. *Balamuthia mandrillaris***

A espécie *Balamuthia mandrillaris* apresenta dois estágios de vida em seu ciclo biológico, o trofozoíto (15-60 µm), responsável pela alimentação e divisão por fissão binária, e o cisto (13-30 µm), forma resistente as adversidades ambientais (MATIN et al., 2008).

Os trofozoítos possuem várias organelas como, mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, um núcleo e nucléolo, apesar de já terem sido observadas formas multinucleadas, e também pseudópodes amplos com estruturas filamentosas (SIDDIQUI; KHAN, 2015).

A espécie se movimenta utilizando os pseudópodes de forma similar a uma aranha, com velocidade aproximada de 0,15 µ/s, sendo considerada a mais lenta das amebas (CABELLO-VÍLCHEZ, 2016). Se alimentam de AVL menores e sob algumas condições

adversas do meio, como falta de nutrientes, extremas temperaturas e pH, acontece o encistamento (MATIN et al., 2008; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Os cistos de *B. mandrillaris* não possuem poros, são uninucleados, esféricos, e apresentam parede celular bastante resistente (CALIXTO et al., 2014). Estudos com microscopia eletrônica de transmissão mostraram a presença de três camadas em sua parede cística, o ectocisto, com localização mais externa, o endocisto, na porção mais interna, e o mesocisto, localizado na porção média (CALIXTO et al., 2014; SIDDIQUI; KHAN, 2015). Quando existem condições favoráveis no ambiente, como temperatura moderada (30-37°C) e disponibilidade de nutrientes, acontece o desencistamento (MATIN et al., 2008).

A espécie *B. mandrillaris* foi primeiramente isolada do cérebro de um primata da espécie mandril, que morreu devido a uma doença neurológica em um zoológico de San Diego, Califórnia (SHUSTER, 2002).

As primeiras manifestações clínicas de EAG por *B. mandrillaris* geralmente são dores de cabeça, rigidez no pescoço, náusea e febre, progredindo para sonolência e mudanças de comportamento, podendo existir dificuldade de compreensão da fala, e se a entrada da ameba acontecer por fissuras na pele, podem ocorrer nódulos com posteriores lesões contendo os trofozoítos (MATIN et al., 2008). A doença é bastante similar a EAG causada pelas espécies de *Acanthamoeba* e pode causar a morte dentro de uma semana ou meses após as primeiras manifestações clínicas (DENNEY et al., 1997).

Aproximadamente 150 casos de infecção foram descritos na literatura, majoritariamente em regiões mais quentes, sendo o continente americano responsável pelo maior número de pacientes (BRAVO; SEAS, 2012). A EAG pode atingir qualquer faixa etária, indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos, e casos de infecções por *B. mandrillaris* tem sido descritos em vários países como, Argentina, Áustria, Brasil, Canadá,

Checoslováquia, Estados Unidos da América, Itália, México, Nigéria, Peru, e Venezuela (DEOL et al., 2000).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Analisar amostras de poeira obtidas de aparelhos condicionares de ar do centro cirúrgico e unidade de tratamento intensivo de um hospital público do município de Ituiutaba, MG, para verificar a presença de amebas de vida livre potencialmente patogênicas.

### **2.2. Específicos**

- Isolar AVL em amostras de poeira de condicionadores de ar provenientes de ambientes hospitalares;
- Cultivar amostras positivas de AVL para identificação morfológica e crescimento de formas vegetativas;
- Realizar a caracterização molecular e determinar o gênero das AVL utilizando a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*-PCR) e confirmação das espécies e genótipos por sequenciamento;

### 3. REFERÊNCIAS

ALVES, D. S. M. M. Avanços no isolamento e caracterização biológica e molecular de *Acanthamoeba* spp (ACANTHAMOEBIDAE) – Ameba de vida livre: determinação experimental do potencial patogênico. 2012. 110f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília. Brasília, 2012.

ALVES, D. S. M. M. Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em mostras de solo e água de piscina no Distrito Federal. 2006. 59f. Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

ASTORGA, B. et al. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. J Eukaryot Microbiol. Nov-Dec; 58(6): 542-4. 2011.

BARON, S. Medical Microbiology, 4th Edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston. 1996.

BEHERA, H. S. et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. Parasit Vectors. 9(1);442. 2016.

BIDDICK, C. J.; ROGERS, L. H.; BROWN, T. J. Viability of Pathogenic and Nonpathogenic Free-Living Amoebae in Long-Term Storage at a Range of Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. p. 859-860. Oct. 1984.

BONILLA-LEMUS, P. et al. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp Parasitol.* 145;Suppl;S28-33. 2014.

BRAVO, F. G.; SEAS, C. *Balamuthia mandrillaris* Amoebic Encephalitis: An Emerging Parasitic Infection. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14, 391–396. 2012.

CABELLO-VÍLCHEZ, A. M. *Balamuthia mandrillaris* en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Infectio*, 20 (2): 107-119. 2016.

CALIXTO, P. H. M. et al. Aspectos biológicos das principais amebas de vida-livre de importância médica. *Biot Amazon.* Macapá, v. 4, n. 2, p. 124-129, 2014

CARLESSO, A. M. et al. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40(3): 316-320, mai-jun, 2007.

CASERO, R. D. et al. Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol.* 54;170-175. 2017.

CHAN, L. L. et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica* 117, 23-30. 2011.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. 2<sup>a</sup> ed, Atheneu Editora, 390 p., 2008.

COGO, P. E. et al. Fatal *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis, Italy. Emerging Infectious Diseases. www.cdc.gov/eid .Vol. 10, No. 10, October 2004.

CORSARO, D. et al. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). Parasitol Res. v.114;7; 2481-2490. 2015.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. More *Acanthamoeba* Genotypes: Limits to the Use of rDNA Fragments to Describe New Genotypes. Acta Protozool.50;49-54. 2011.

CROZETTA, M. A. S. Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. 2007.46f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

DE JONCKHEERE, J. The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. Future microbiol.7.5-7. 2012.

DENNEY, C. F. et al. Amebic Meningoencephalitis Caused by *Balamuthia mandrillaris*: Case Report and Review. Clin Infect Dis. 25:1354–8. 1997.

DEOL, M. D. I. et al. Encephalitis Due to a Free-Living Amoeba (*Balamuthia mandrillaris*): Case Report with Literature Review. Surg Neurol, vol. 53 (pg. 611-616). 2000.



- DINGLE, A. D.; FULTON, C. Development of the flagellar apparatus of *Naegleria*. J. Cell Biol. 31, 43-54. 1966.
- EDAGAWA, A. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. Parasitol Res. 105:1109–1117. 2009.
- FUERST, P. A.; BOOTON, G. C.; CRARY, M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. J Eukaryot Microbiol 62:69–84.2015
- GAST, R. J. et al. Subgenus Systematics of *Acanthamoeba*: Four Nuclear 18s rDNA Sequence Types. J Euk Microbiol. 43(6);498-504. 1996.
- GRÜN, A. L.; STEMPLEWITZ, B.; SCHEID, P. First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. Parasitol Res. 13(6);2395-400. 2014
- HEGGIE, T. W. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational Waters. Travel Med Infect Dis. 8(4);201-6. 2010.
- JAYASEKERA, S. et al. Post-mortem culture of *Balamuthia mandrillaris* from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular endothelial cells. J Med Microbiol. 53;1007-1012. 2004.

KEMBLE, S. K. et al. Fatal *Naegleria fowleri* Infection Acquired in Minnesota: Possible Expanded Range of a Deadly Thermophilic Organism. *Clin Infect Dis*, vol. 54 (pg. 805-809). 2012.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30, 564–595, 2006.

KILVINGTON, S.; MANN, P. G.; WARHURST, D. C. Pathogenic *Naegleria* Amoebae in the waters of bath: a fatality and its consequences. From Kellaway, G. A. (ed) *Hot Springs of Bath*, p. 89-96. 1991.

LASJERDI, Z. et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran Iran. *Parasitol Res.* 109;575-80. 2011.

MACEDO, J. P. et al. Isolamento de *Acanthamoeba* spp. em amostras de ar condicionado do Hospital Universitário de Florianópolis, SC. 2015. Seminário de Iniciação Científica, 2015, Florianópolis-Santa Catarina. Seminário/IC- SIC/UFSC, 2015.

MACIVER, S. K. et al. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *Eur J Protistol.* 49(2);217-21. 2013.

MARÇAL, E. C. et al. Encefalite amebiana granulomatosa: relato de caso. *Rev. Ciênc. e Saúde*, 2016.

MARCIANO-CABRAL, F. Biology of *Naegleria* spp. Microbiol Rev, p. 114-133. Mar. 1988.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. A. The immune response to *Naegleria fowleri* Amebae and Pathogenesis of infection. FEMS Immunol Med Microbiol 51, p. 243–259. 2007.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clin Microbiol Rev, p. 273–307, Apr. 2003.

MATIN, A. et al. Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. Clin Microbiol Rev, p. 435–448. 2008.

MOUSSA, M. et al. Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies). PLoS ONE. 8(1); e54414. 2013.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NUPRASERT, W. et al. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. J Clin Microbiol. 48(12);4636-40. 2010.

OTTA, D. A. et al. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 111(5);2017-22. 2012.

PACHECO, L. G.; MARTINS, A. V. A importância do estudo das amebas de vida livre. Saúd Ambient Rev, Duque de Caxias, v.3, n.1, p.57-65, jan-jun, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e aplicações, Vol 1. Makron Books: São Paulo.1997.

PIERINI, M. A. Ar condicionado em ambientes assépticos. Rev Bras Enferm, Volume 27, Number 4, pp. 455-461(7). 1974.

POSSAMAI, C. O. Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em Vitória e região metropolitana (ES). 2012. 122f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2012.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida) Protistologica. 13: 557–598, 1977.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. J Eukaryot Microbiol. 60(6);626-33. 2013.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REZAEIAN, M. et al. Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Different Environmental Sources. Iranian J Parasitol: Vol.3, No.1, pp. 44-47, 2008.

RIBEIRO, D. Como funciona o ar-condicionado convencional e o modelo Split. Disponível em: <<http://www.techtudo.com.br/artigos/noticia/2013/05/como-funciona-o-ar-condicionado-convencional-e-o-modelo-split.html>>. Acesso em: 10 de mar. 2018.

ROCHA-AZEVEDO, B. Interação de amebas de vida livre patogênicas (*Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris*) com substratos biológicos in vitro. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ROCHA-AZEVEDO, B.; TANOWITZ, H. B.; MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis*: 251406. 2009.

SALAZAR, H. C.; MOURA, H.; RAMOS, R. T. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev. Saúde públ. S. Paulo*. 16: 261-7. 1982.

SAWYER, T. K. Free-Living Pathogenic and Nonpathogenic Amoebae in Maryland Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 1074-1077. Apr. 1989.

SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol.* 39(5);1903-1911. 2001.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clin Microbiol Rev.* p. 342–354. July. 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34: 1001–1027. 2004.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. *Balamuthia mandrillaris*: Morphology, biology, and virulence. *Trop Parasitol*. 5(1): 15–22. Jan-Jun. 2015.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*.5:6. 2012.

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública*; 37(2):242- 2003.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Neuroinfecção por *Naegleria fowleri*: aspectos clínico-terapêuticos, epidemiológicos e ecológicos. *Rev Neurocienc*. 15/4: 310-316. 2007.

STAGGEMEIER, R. et al. Detection and quantification of human adenovirus genomes in *Acanthamoeba* isolated from swimming pools. *An Acad Bras Cienc*. 88;(1 Suppl.);635-641. 2016.

STOTHARD, D. R. et al. The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types. *J Euk Microbiol*. 45;1;45-54. 1998.

TEIXEIRA, L. H. Ocorrência de amebas de vida-livre, dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, em pisos de ambientes internos. 2008. 79f. Dissertação de Mestrado – Universidade Católica de Santos. Santos, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12. ed., Porto Alegre: artmed, 2017.

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol.* 60;399-405. 2012.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploide*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 50 (pg. 1-26), 2007.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 4408–441, Oct. 2000.

***Este manuscrito foi preparado segundo as normas da Revista Saúde Pública.***

***As normas se encontram anexo.***

IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE EM UM HOSPITAL PÚBLICO NO  
MUNICÍPIO DE ITUIUTABA, MG

IDENTIFICATION OF FREE-LIVING AMOEBAE IN A PUBLIC HOSPITAL  
IN THE MUNICIPALITY OF ITUIUTABA, MG

IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS EM HOSPITAL DE ITUIUTABA, MG

**João Diogo Garcia da Fonseca**

Laboratório de Ciências Biomédicas

Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal

Universidade Federal de Uberlândia

Rua: 20, 1600, Bairro: Tupã, ZIP CODE: 38304-402, Ituiutaba, Minas Gerais, Brasil.

Tel.: +55-34-3271-5240

**[joaodiogogf@gmail.com](mailto:joaodiogogf@gmail.com)**

**Cecilia Barbosa Gomes**

Laboratório de Parasitologia

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Av. Frei Paulino, 30, Bairro Abadia. ZIP CODE: 38025-180, Uberaba, MG, Brasil

Tel: +55 34 3318-5259

**[cis.sa.barbosa11@gmail.com](mailto:cis.sa.barbosa11@gmail.com)**

**Karine Rezende de Oliveira (Autor para correspondência)**

Laboratório de Ciências Biomédicas

Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal

Universidade Federal de Uberlândia

Rua: 20, 1600, Bairro: Tupã, ZIP CODE: 38304-402, Ituiutaba, Minas Gerais, Brasil.

Tel.: +55-34-3271-5240

**[karinerezende@ufu.br](mailto:karinerezende@ufu.br)**



## RESUMO

As amebas de vida livre (AVL), protozoários que vivem de forma livre ou como parasitas, são patógenos de grande relevância para a Saúde Pública, sendo os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* responsáveis por acometer principalmente indivíduos imunossuprimidos. Avaliou-se a presença destes microrganismos em um hospital público de Ituiutaba, MG, na poeira de ar-condicionado do centro cirúrgico (CC) e unidade de terapia intensiva (UTI). Amostras positivas na cultura e análise morfológica foram submetidas a análise molecular e posteriormente sequenciamento. Foram colhidas 48 amostras sendo 32 (66%) do CC e 16 (34%) da UTI. Destas, 10,4% (5/32) de amostras do CC estavam positivas na microscopia. Quanto a UTI, 75% (12/16) apresentaram cistos. A análise molecular mostrou que 6,25% (2/32) das amostras do CC foram positivas para *Acanthamoeba* e 3,2% (1/32) positivas para *Balamuthia*, na UTI 50% (8/16) continham material genético de *Acanthamoeba* e 43,7% (7/16) de *Balamuthia*. Os genótipos de *Acanthamoeba* encontrados foram T3 e T4. Este trabalho mostra a ampla distribuição de isolados de *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia* spp. em ar-condicionados e sugere-se que estes microrganismos sejam importantes pois atuam como reservatórios e disseminadores de diversos patógenos.

**Palavras chaves:** *Acanthamoeba*; *Balamuthia*; hospitais; ar-condicionado

## ABSTRACT

The free-living amoebae (FLA), organisms that can be free-living in nature or parasites, are pathogens of great relevance to Public Health, and the genus *Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Balamuthia* are responsible for illness especially in immunosuppressed patients. It was evaluated the occurrence of this microorganisms in a public hospital in Ituiutaba, MG, in air conditioner dust samples of the operating room (OR) and intensive care unit (ICU). Positive samples in culture and morphological examination were submitted to molecular analysis and sequenced. A total of 48 samples were collected, 32 (66%) of the OR and 16 (34%) belonging to the ICU. Of these, 10.4% (5/32) of OR samples were positive. As for ICU, 75% (12/16). The molecular analysis showed that 6.25% (2/32) of the OR samples were positive for *Acanthamoeba* and 3.2% (1/32) positive for *Balamuthia*, in the ICU 50% (8/16) contained genetic material of *Acanthamoeba* and 43.7% (7/16) from *Balamuthia*. The *Acanthamoeba* genotypes found were T3 and T4. This study demonstrated the distribution of *Acanthamoeba* spp. and *Balamuthia* spp. in air conditioning units and suggest that these microorganisms are important reservoirs of pathogens.

**Keywords:** *Acanthamoeba*; *Balamuthia*; hospitals; Air Conditioning.

## INTRODUÇÃO

As amebas compõem um amplo grupo de protozoários que se locomovem através do movimento amebóide, utilizando prolongamentos citoplasmáticos chamados de pseudópodes<sup>1</sup>. Além da locomoção, os pseudópodes são responsáveis pela captura de alimentos, que são envolvidos pelos mesmos e internalizados em vacúolos digestivos dentro do citoplasma<sup>2</sup>.

As amebas de vida livre (AVL) são encontradas em vários habitats pelo mundo, tanto no solo quanto na água, podendo se alimentar de bactérias, leveduras e outros organismos. Não são parasitas obrigatórios e podem completar seu ciclo de vida sem a participação de um hospedeiro<sup>3</sup>.

Esses protozoários são muitas vezes denominados como anfizóicos, por apresentarem capacidade de viver dentro de um organismo como parasitas ou no ambiente de forma livre<sup>4</sup>. Por meio desse comportamento dualista, esses organismos podem causar doenças em humanos e animais, sendo os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* os principais agentes etiológicos conhecidos das encefalites e ceratites humanas causadas por amebas. Deste modo, o encontro de AVL potencialmente patogênicas em amostras ambientais de locais com frequente trânsito de pessoas, como os hospitais, é de grande importância para a determinação de riscos como possíveis fontes de infecções aos seres humanos<sup>5</sup>

As AVL podem ser encontradas no ar, lagos, solo (adubado ou não), rios, piscinas (são resistentes ao cloro, desinfetantes, temperaturas extremas e pH), poeira, hospitais, lentes de contato e águas de torneiras, demonstrando a natureza onipresente desses organismos<sup>6</sup>. Apresentam ampla distribuição geográfica, sendo

facilmente isolados em todos os continentes, principalmente os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*<sup>7,8</sup>. O gênero *Balamuthia* é encontrado no solo, tem comportamento pouco conhecido, é de difícil isolamento e possui uma lenta taxa de crescimento *in vitro*, ao contrário do gênero *Acanthamoeba*<sup>4,9</sup>.

O contato com estes protozoários, através de fissuras na pele ou córnea e a aspiração e/ou inalação de água contaminada ou ar pelo trato respiratório superior é a porta de entrada para as infecções<sup>7,4</sup>. Cermeño et al.<sup>10</sup> (2006), apontam que nas últimas quatro décadas 200 casos de infecção por *Acanthamoeba* foram descritos por todo o mundo, além de 100 casos por *Balamuthia* e 200 casos por *Naegleria*.

O aparelho condicionador de ar funciona como um concentrador, sugando o ar do cômodo que passa por um filtro e é devolvido ao mesmo, espalhando de forma eventual poeira contendo microrganismos concentrados nos filtros quando estes se encontram saturados. Em um trabalho realizado a partir de amostras de ar condicionado do Hospital Universitário de Florianópolis, SC, foram analisadas 54 amostras, sendo 41 (75,9%) positivas para AVL<sup>11</sup>. O clima tropical do Brasil, geralmente quente durante todo o ano, estimula o uso de aparelhos de ar condicionados. Isso pode aumentar o risco de exposição a cistos e/ou trofozoítos de AVL presentes no ar, principalmente em ambientes hospitalares e locais fechados com grande aglomeração de pessoas.

O objetivo deste estudo foi analisar amostras de poeira provenientes de grades e filtros de aparelhos de ar condicionado do Centro Cirúrgico (CC) e Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) de um hospital público do município de Ituiutaba, MG, para verificar a presença e identificar as amebas de vida livre potencialmente patogênicas.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta das amostras**

As amostras de poeira foram coletadas dos filtros e grades dos aparelhos de ar condicionado localizados no centro cirúrgico (CC) e unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital público, em Ituiutaba, MG.

Foram coletadas 48 amostras de poeira de seis aparelhos de ar condicionado, sendo 24 (50%) amostras da região da grade e 24 (50%) do filtro interno. Quanto a distribuição dos aparelhos, dois estão localizados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), obtendo destes 16 amostras (34%) e 4 no Centro Cirúrgico (CC), com 32 amostras coletadas (66%). Foram colhidas 8 amostras de cada um dos 6 aparelhos de ar condicionado.

As coletas foram realizadas no período de março a maio de 2018, durante a manutenção dos aparelhos pela equipe técnica responsável. Para a coleta foi utilizado hastes de algodão estéreis, os quais foram passados de forma circular na parte interna dos filtros e grades. Em seguida estas hastes foram colocadas em tubos estéreis contendo uma solução de Tampão Fosfato Salino (*Phosphate-buffered saline*-PBS) e levadas para o Laboratório de Ciências Biomédicas do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, ICENP-UFU.

### **Cultivo de amebas de vida livre (AVL)**

O material colhido foi centrifugado e o sedimento ressuspendido em 4 mL da própria solução centrifugada, onde 1,5 mL foram misturados com guanidina-EDTA (Guanidina-HCl 6M, EDTA dissódico 0,2%, pH 8,0) e conservados a 4°C até o seu uso, enquanto o restante (2,5 mL) foi semeado em cultura em meio Agar-soja a

concentração de 1,5% e 0,2% respectivamente durante 10 dias, a 37°C. Após este período foi colhida uma amostra das culturas, centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e analisado o sedimento para verificar a presença de cistos e trofozoítos.

### **Caracterização morfológica**

A identificação dos isolados de AVL foi realizada com base na morfologia dos cistos segundo Pussard e Pons<sup>12</sup> (1977), utilizando aumento de 400x e 1000x.

### **Extração de DNA e PCR**

A extração de DNA, foi realizada utilizando o kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep (Promega, USA) conforme recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) conforme especificações do aparelho.

Para confirmação da identificação por microscopia dos gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia*, foi empregada a técnica da PCR. O material colhido foi mantido em guanidina e em seguida realizada a técnica para identificação do DNA dos protozoários.

### ***Acanthamoeba* spp**

A sequência alvo está localizada no gene ssu rDNA que codifica a subunidade menor 18S do RNA ribossomal. Os oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho foram sintetizados por Extend Biotecnologia Ltda, São Paulo, Brasil.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA, 1mM de cada primer JDP1 (5'GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA3'), o

primer iniciador (*Forward*), e JDP2 (5'TCTCACAAAGCTGCTAGGGAGTCA3'), o primer reverso, que amplificam a subunidade menor da região 18S do DNA ribossomal referente a 423-551 pb de cepas patogênicas e 936-1402 pb de cepas não patogênicas<sup>13</sup>, 100 mM de dNTPs, 1X de tampão de reação (providenciado com a Taq DNA Polimerase), 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Promega, USA). A reação aconteceu nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos (95°C–1 minuto, 63°C–1 minuto, 72°C–1 minuto), seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos no termociclador MJ Research PTC-100. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com 1X de GelRed (Biotium, USA) através de um transiluminador UV (Spectroline, USA). Os produtos das amostras positivas, foram precipitados com etanol 70% e sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares (Brasil).

### ***Balamuthia* spp**

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA, 1mM de cada primer Balspec 16S (5'-CGCATGTATGAAGAAGACCA-3') e Balspec 16S, (5'-TTACCTATATAATTGTCGATACCA-3')<sup>14</sup>, que amplificam um produto de 1075 bp da região 16S rRNA mitocondrial, 100 mM de dNTPs, 1X de tampão de reação (fornecido junto com a Taq DNA Polimerase), 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Promega, USA), a reação também aconteceu nas seguintes condições de amplificação: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos (95°C–1 minuto, 48°C–2 minutos e 72°C–3 minutos) no termociclador MJ Research PTC-100, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com 1X de GelRed (Biotium, USA) e visualizados num transiluminador UV (Spectroline, USA).

## **Sequenciamento**

O sequenciamento foi realizado apenas para amostras positivas (por PCR) para *Acanthamoeba*.

O sequenciamento foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares (Brasil) pelo método Sanger (desoxi-terminal), os cromatogramas fornecidos foram analisados no programa Chromas Pro 2.1.6 para obtenção das sequências consenso. Foi realizado Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) inicialmente para avaliar a identidade das amostras, posteriormente foram alinhadas com amostras referência a vários genótipos de *Acanthamoeba* no programa SeaView 4.5.2, utilizando o método ClustalW 1.8. A análise filogenética foi realizada com auxílio do software Mega 7.0 utilizando o método Maximum Composite Likelihood, (Timura-3 parâmetros com 1000 bootstrap). Todas as sequências obtidas neste trabalho foram depositadas no GenBank® (MK192683 - MK192688).

## **RESULTADOS**

### **Microscopia de Luz**

Considerando a análise pela microscopia de luz, 10,4% das amostras (5/32) colhidas no CC estavam contaminadas por amebas de vida livre. Em relação as amostras colhidas nos aparelhos da UTI, 75% (12/16) apresentaram cistos de amebas de vida livre.

Desta forma, independentemente do local de coleta, foram identificados pela técnica de microscopia de luz, cistos e trofozoítos de amebas de vida livre em 35,4% (17/48) das amostras de ar-condicionado do hospital (Figura 01).



### Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das 32 amostras de poeira colhidas no CC 6,25% (2/32) foram positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba* e 3,2% (1/32) positiva para amebas do gênero *Balamuthia*.

Análise das amostras da UTI mostraram que 50% (8/16) continham material genético de *Acanthamoeba* e 43,7% (7/16) de *Balamuthia* (Figura 02). Não foram identificados microrganismos das espécies *Naegleria fowleri*.

Importante ressaltar que apenas nas amostras de poeira colhidas nos aparelhos de ar condicionado da UTI foi possível encontrar DNA de microrganismos das duas espécies de amebas (5/16) (Figura 02 e Figura 03).

Além disso, a análise genética possibilitou observar que 35,3% (5/17) das amostras positivas na microscopia de luz foram devidamente comprovadas através da técnica molecular.

Em seguida foi realizado o sequenciamento das amostras para identificação do genótipo específico de *Acanthamoeba*. Foi possível identificar pela análise filogenética que as amostras (Itba8, Itba12 e Itba14) pertencem ao genótipo T3 e as amostras (Itba16, Itba17 e Itba18) ao genótipo T4, conforme apresentado no dendograma (Figura 04).

### DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada maior prevalência de amebas da espécie *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrilaris* nos locais avaliados. Este resultado confirma a significativa distribuição em ambientes diversos destes organismos<sup>15,16,17</sup>.

Foi demonstrado em nosso estudo a alta prevalência de AVL potencialmente patogênicas (35,4%) em amostras de poeira originárias da Unidade de Terapia

Intensiva e Centro Cirúrgico. Em estudo realizado em um hospital público da cidade de Porto Alegre, RS, Carlesso et al.<sup>5</sup> (2007) evidenciaram a presença de AVL em 11 (23,4%) amostras de poeira, sendo provenientes de cinco ambientes hospitalares: cozinha, emergência, Centro Cirúrgico Ambulatorial, Centro Cirúrgico e UTI pediátrica. Em outro trabalho feito por Crozetta<sup>6</sup> (2007) no Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba, PR, foram encontrados cistos de amebas de vida livre em todas as 30 amostras (100%) realizadas em ambientes distintos.

Amebas da espécie *Acanthamoeba* podem atuar, em condições específicas do ambiente e do hospedeiro, como parasitos oportunistas, por desenvolver quadros infecciosos em indivíduos imunodeprimidos e ceratites graves em usuários de lente de contato<sup>18</sup>. Isso demonstra o perigo associado a presença desses organismos potencialmente patogênicos em ambientes hospitalares. Além da encefalite amebiana granulomatosa (EAG) o gênero *Acanthamoeba* tem sido associado com a veiculação de alguns endossimbiontes patogênicos, como por exemplo, *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*<sup>5,19</sup>.

Em nosso estudo foi observada grande prevalência de amebas da espécie *Acanthamoeba* spp. (20,8%) nas amostras de poeira do CC e UTI, confirmando assim a expressiva distribuição em variados ambientes destas amebas<sup>15,16,17</sup>. Isso ressalta a importância do encontro destes protozoários, de maneira significativa na UTI, nestes locais por carrearem bactérias de importância médica, principalmente os achados da UTI, responsável pelo maior número de amostras positivas

A espécie *Balamuthia mandrillaris* é a única do seu gênero que infecta humanos e animais, sendo relatada desde 1990 como a causa de abscessos cerebrais, também denominados de encefalite amebiana granulomatosa (EAG), e de infecções na pele por onde ocorre a entrada através de fissuras<sup>20,21,22</sup>. A partir de

uma coleta de poeira em um grande prédio público localizado em Teerã, Irã, Niyati<sup>23</sup> (2009) e seus colaboradores conseguiram identificar a presença de *Balamuthia mandrillaris* e estabeleceram, após a confirmação por PCR, um novo isolado (ID-19). Em nosso estudo foi possível identificar que 16,5% (8/48) das amostras apresentaram amebas desta espécie. Aquela pesquisa, assim como o presente estudo, possui relevância devido a origem da amostra, não representando uma amostra de solo ou tecido infectado, local de coleta mais comum das amostras positivas para *Balamuthia mandrillaris*, evidenciando assim o primeiro relato da presença deste organismo em ambiente hospitalar na cidade de Ituiutaba, MG.

A identificação das amebas através dos genótipos é de extrema importância para conhecer os isolados circulantes e traçar estratégias para controle e tratamento.

Estudo realizados envolvendo a genotipagem de *Acanthamoeba* spp., caracterizados de T1 a T20, foram realizados em diferentes regiões do mundo e foram considerados um avanço para identificação das espécies, uma vez que a análise morfológica restringe esse reconhecimento<sup>24,13,25,26</sup>.

Nosso estudo demonstrou que 16,6% das amostras positivas pertenciam ao genótipo T3 [Itba8 (A8), Itba12 (A12) e Itba14 (A14)] e a mesma porcentagem ao genótipo T4 [(Itba16 (A16), Itba17(A17) e Itba18 (A18)].

Considerando genótipos específicos, o T4 foi reconhecido por ser encontrado de forma ampla no ambiente e estar envolvido em infecções neurológicas e oculares. Outro genótipo de grande importância clínica é o T3, descrito como responsável pelo desenvolvimento de quadros de ceratites em indivíduos acometidos<sup>27,28,29,30,31,32</sup>.

Estudos diversos mostram a presença destes genótipos envolvidos com quadros clínicos importantes. Foi detectado o genótipo T4 em amostras de líquido de pacientes com encefalite granulomatosa na Índia<sup>33</sup>, enquanto que na Argentina este mesmo genótipo foi encontrado durante estudos que analisavam as amostras de raspado ocular e lentes de contato<sup>34</sup>. Outra observação importante foi no Brasil, onde se detectou protozoários deste genótipo em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, além do genótipo T3<sup>35</sup>.

Atualmente as infecções causadas por AVL têm apresentado grande importância, por serem de diagnóstico difícil, além de apresentarem altas taxas de letalidade<sup>36</sup>. Em um estudo realizado por Chan et al.<sup>37</sup> (2011) em ares-condicionados instalados em um prédio de quatro andares localizado em Kuala Lumpur, na Malásia, foi verificada a presença de *Acanthamoeba* spp. em 20 (23%) amostras de poeira das 87 analisadas. Outro trabalho realizado a partir de amostras de ares-condicionados do Instituto de Saúde Pública do Chile em Santiago, Chile, demonstrou positividade nas amostras para três genótipos distintos de *Acanthamoeba*, sendo eles T3, T4 e T11<sup>38</sup>. Esses resultados corroboram para a literatura acerca das AVL, demonstrando assim a ubiquidade desses organismos encontrados em lugares tão distintos do mundo.

O resultado do nosso estudo mostrou a presença de amebas das espécies *Balamuthia mandrillaris* e *Acanthamoeba*, sendo esta última representada pelos genótipos T3 e T4 de grande distribuição ambiental e importância clínica por serem responsáveis pelo desenvolvimento de doenças do sistema nervoso central (SNC) e dos olhos. Contudo o encontro destes microrganismos em locais associados a hospitais, principalmente CC e UTI, onde os pacientes estão muitas vezes debilitados e vulneráveis imunologicamente é de extrema importância considerando

que as amebas podem servir de reservatório para bactérias e outros microrganismos patogênicos que podem levar os pacientes a óbito.

## REFERÊNCIAS

1. Rocha-Azevedo B. Interação de amebas de vida livre patogênicas (*Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris*) com substratos biológicos *in vitro* [Tese de Doutorado]. [Rio de Janeiro (RJ)]: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; 2008.
2. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: Conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books; 1997. v.11. p. 281.
3. Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009; v.2009;Article ID 251406;14 p. DOI:10.1155/2009/251406
4. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 2004;34;1001-1027. DOI:10.1016/j.ijpara.2004.06.00
5. Caerlesso AM, Simonetti AB, Artuso GL, Rott MB. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(3);316-320. ISSN:1678-9849

6. Crozetta MAS. Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar [Dissertação de Mestrado]. [Curitiba (PR)]: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica do Centro de Ciências Biológicas; 2007.
7. Alves DSMM. Avanços no isolamento e caracterização biológica e molecular de *Acanthamoeba* spp (ACANTHAMOEBIDAE) – Ameba de vida livre: determinação experimental do potencial patogênico. [Tese de Doutorado]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde; 2012.
8. Calixto PHM, Trindade FR, Ballarini AJ, Dias CAGM, Campos CEC, Oliveira JCS. Aspectos biológicos das principais amebas de vida-livre de importância médica. *Bio Amaz.* 2014;v.4;n.2;124-129. DOI:10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n2p124-129
9. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploide*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;vol.50;1-26. DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x
10. Cermeño JR, Hernández I, Yasin HE, Tinedo R, Sánchez R, Pérez G, et al. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Epidemiological study in Anzoategui State, Venezuela. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):264-268. DOI:10.1590/S0037-86822006000300007

11. Macedo JP, Wopereis DB, Casara F, Silva SB, Buchele MLC, Caumo KS. Isolamento de *Acanthamoeba* spp. em amostras de ar condicionado do Hospital Universitário de Florianópolis, SC. Seminário de Iniciação Científica; 2015; Florianópolis, SC. Seminário/IC- SIC/UFSC.
12. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 1977;13: 557-598.
13. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(5);1903-1911. DOI:10.1128/JCM.39.5 .1903-1911.2001
14. Jayasekera S, Sissons J, Tucker J, Rogers C, Nolder D, Warhurst D, et al. Post-mortem culture of *Balamuthia mandrillaris* from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*. 2004;53;1007-1012. DOI:10.1099/jmm.0.45721-0
15. Staggemeier R, Arantes T, Caumo KS, Rott MB, Spilki FR. Detection and quantification of human adenovirus genomes in *Acanthamoeba* isolated from swimming pools. *An Acad Bras Cienc*. 2016;88;(1 Suppl.);635-641. DOI:10.1590/0001-3765201620150151

16. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* 2012;60;399-405. DOI:10.1016/j.patbio.2012.03.002
17. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012;5:6. DOI:10.1186/1756-3305-5-6
18. Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2000;v.66;n.10;4408-4413. DOI:10.1128/AEM.66.10.4408-4413.2000
19. Silva MA, Rosa JA. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública*. 2003;37(2);242-246. DOI:10.1590/S0034-89102003000200013
20. Bravo FG, Seas C. *Balamuthia Mandrillaris* Amoebic Encephalitis: An Emerging Parasitic Infection. *Curr Infect Dis*. 2012;14;391-396. DOI:10.1007/s11908-012-0266-4
21. Matin A, Siddiqui R, Jayasekera S, Khan NA. Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21;3;435-448. DOI:10.1128/CMR.00056-07



22. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p.339.
23. Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaeian M, Martin-Navarro CM, Haghi AM, Maciver SK, et al. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitol Res.* 2009;106:279-28. DOI:10.1007/s00436-009-1592-9
24. Bonilla-Lemus P, Villegas ASC, Jiménez JC, Vázquez AL. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp Parasitol.* 2014;145;Suppl;S28-33. DOI:10.1016/j.exppara.2014.07.001
25. Moussa M, De Jonckheere JF, Guerlotté J, Richard V, Bastaraud A, Romana M, et al. Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies). *PLoS ONE.* 2013;8(1);e54414. DOI:10.1371/journal.pone.0054414
26. De Jonckheere J. The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future microbiol.* 2012;7.5-7. DOI:10.2217/fmb.11.141
27. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational Waters. *Travel Med Infect Dis.* 2010;8(4);201-6. DOI:10.1016/j.tmaid.2010.06.001
24. Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for

*Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.* 2015;v.114;7; 2481-2490. DOI:10.1007/s00436-015-4445-8

25. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, et al. The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types. *J Euk Microbiol.* 1998;45;1;45-54. DOI:10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x

26. Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ. Subgenus Systematics of *Acanthamoeba*: Four Nuclear 18s rDNA Sequence Types. *J Euk Microbiol.* 1996;43(6);498-504. DOI:10.1111/j.1550-7408.1996.tb04510.x

27. Grün AL, Stemplewitz B, Scheid P. First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. *Parasitol Res.* 2014;13(6);2395-400. DOI:10.1007/s00436-014-3918-5

28. Maciver SK, Asif M, Simmen MW, Lorenzo-Morales J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *Eur J Protistol.* 2013;49(2);217-21. DOI:10.1016/j.ejop.2012.11.004

29. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 2013;60(6);626-33. DOI:10.1111/jeu.12069

30. Corsaro D, Venditti D. More *Acanthamoeba* Genotypes: Limits to the Use of rDNA Fragments to Describe New Genotypes. *Acta Protozool.* 2011;50;49-54. DOI:10.4467/16890027AP.11.006.0006.
31. Lasjerdi Z, Niyyati M, Haghghi A, Shahabi S, Biderouni FT, Taghipour N, et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran Iran. *Parasitol Res.* 2011;109;575-80. DOI:10.1007/s00436-011-2288-5.
32. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12);4636-40. DOI:10.1128/JCM.01090-10
33. Behera HS, Satpathy G, Tripathi M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasit Vectors.* 2016;9(1);442. DOI:10.1186/s13071-016-1729-5
34. Casero RD, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teherán A, et al. Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2017;54;170-175. DOI:10.1016/j.meegid.2017.06.031
35. Otta DA, Rott MB, Carlesso AM, Silva OS. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti*

(Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012;111(5);2017-22. DOI: 10.1007/s00436-012-3050-3

36. Marçal EC, Teixeira GHS, Cota MAL, Magalhães TD, Paula AB, Barros LS. Encefalite Amebiana Granulomatosa: Relato de Caso. *Rev cienc saude.* 2016.

37. Chan LL, Mak JW, Low YT, Koh TT, Ithoi I, Mohamed SM. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Trop.* 2011;117(1);23-30. DOI: 10.1016/j.acta tropica.2010.09.004

38. Astorga B, Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, Alarcón V, Moreno J, González AC, et al. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. *J Eukaryot Microbiol.* 2011;58(6);542-4. DOI:10.1111/j.1550-7408.2011.00584.x

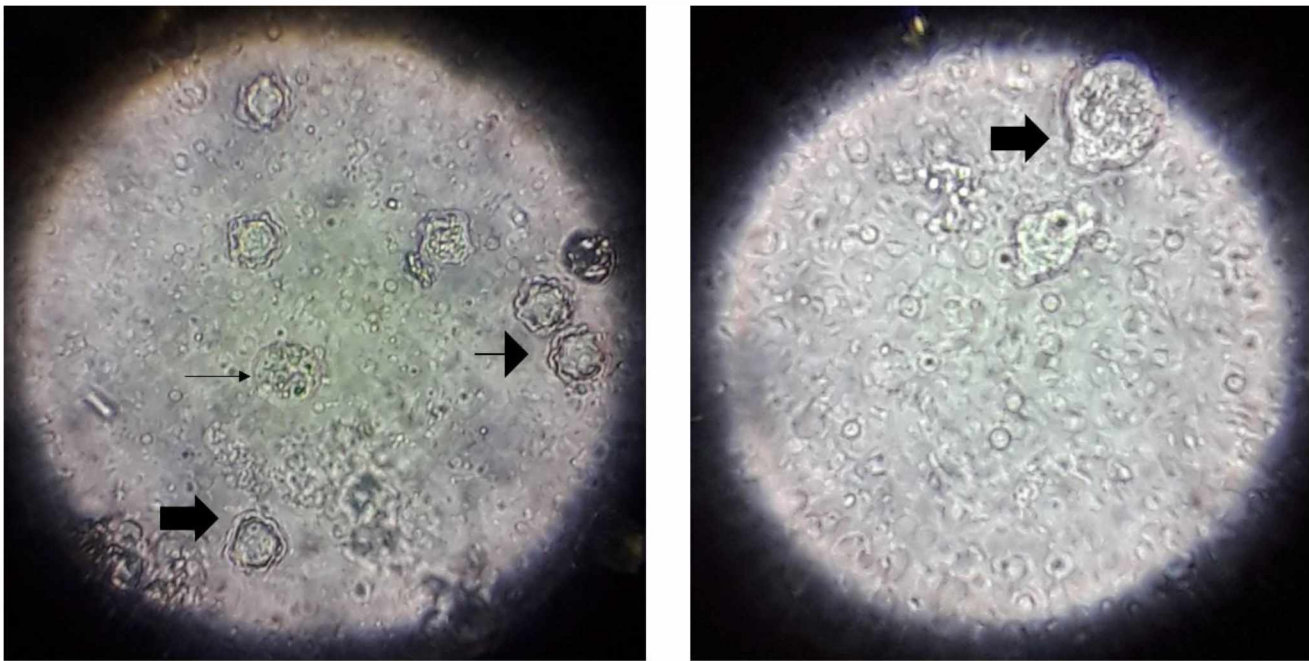


Figura 01- (A) Cistos de *Acanthamoeba* spp. com endocisto estrelar (cabeça de seta) e ectocisto redondo (seta romba); Cisto suspeito de *Balamuthia* (seta fina); (B) trofozoíto com pseudópodes lobopódes (setas) visualizados em microscopia óptica em aumento de 1000X.

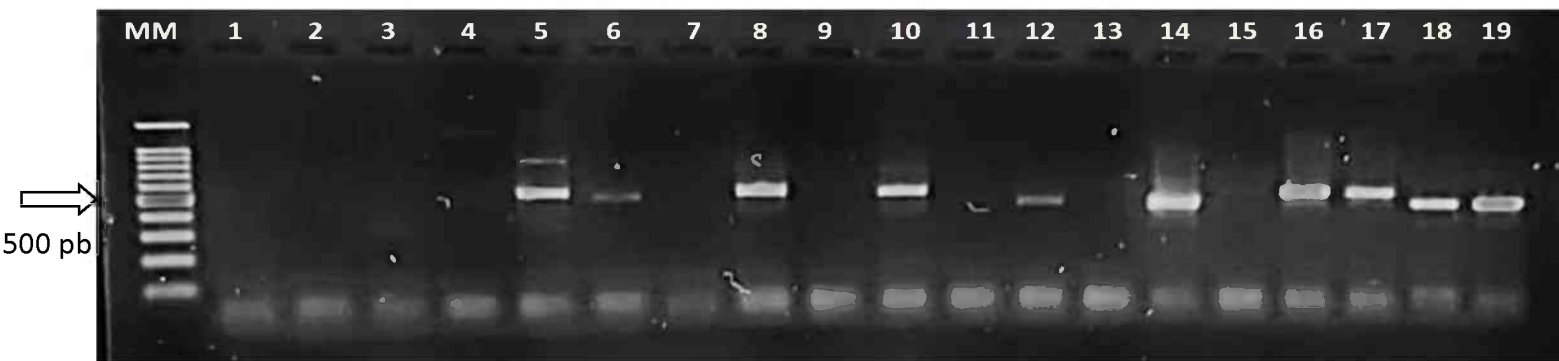


Figura 02 – Análise de PCR de *Acanthamoeba* spp. isolada de poeira de aparelhos de ar condicionado em um hospital público no município de Ituiutaba, MG. **MM**: Marcador de tamanho molecular (pb); Amostras do Centro Cirurgico (CC): A1; A13; A14; A15; A19. Amostras da Unidade de Terapia Intensiva (UTI): A2-A12; A16-A18.  
Foram consideradas positivas: A5;A6;A8;A10;A12;A14;A16-A19.

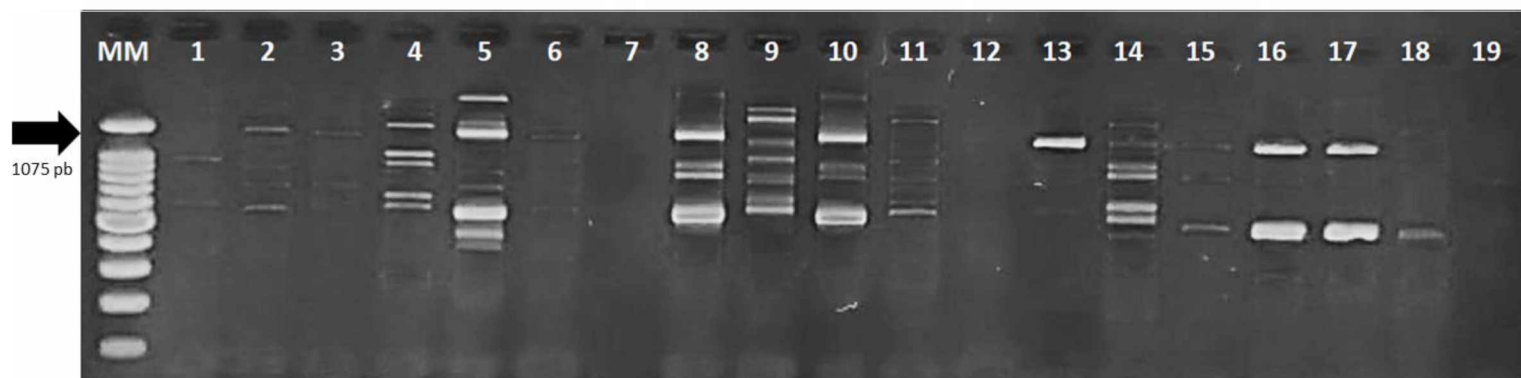


Figura 03 – Análise de PCR de *Balamuthia* ssp. isolada de poeira de aparelhos de ar condicionado em um hospital público no município de Ituiutaba, MG. **MM**: Marcador de tamanho molecular (pb); Amostras do Centro Cirurgico (CC): A1; A13; A14; A15; A19. Amostras da Unidade de Terapia Intensiva (UTI): A2-A12; A16-A18. Foram consideradas positivas: A4;A5;A8;A9;A10;A13;A16; A17.

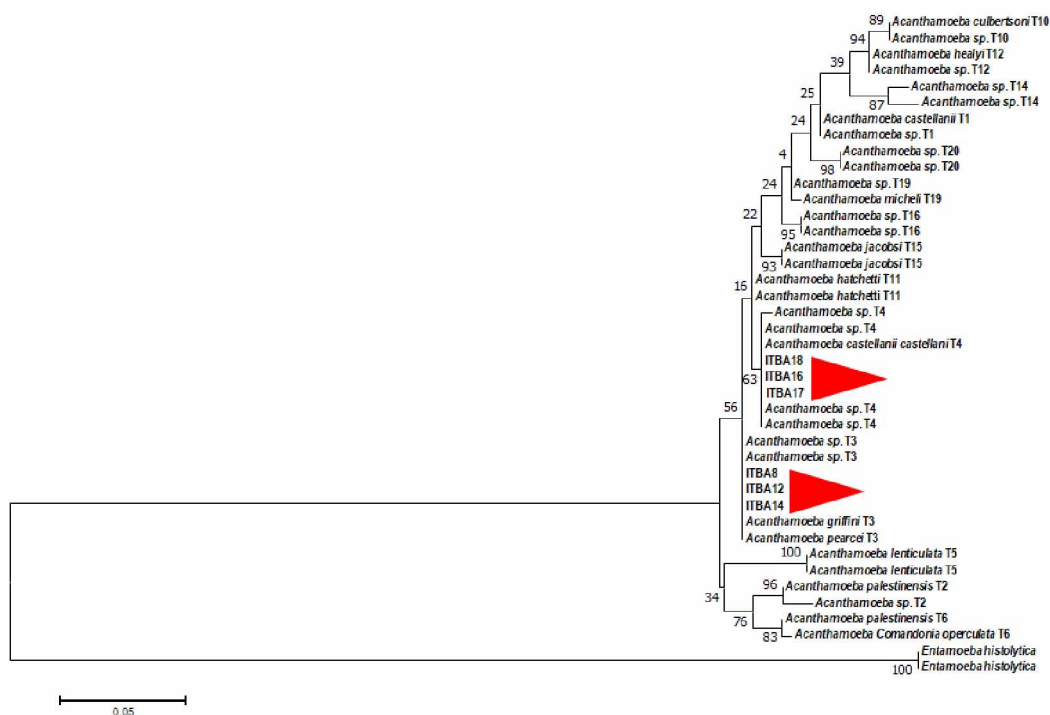


Figura 04- – Análise filogenética da região 18S (SSU) do rDNA utilizando o Maximum Composite Likelihood (MCL) e Bootstrap de 1000 para identificar os genótipos de *Acanthamoeba* spp. em amostras de poeira em aparelhos condicionadores de ar ar condicionado no município de Ituiutaba, MG

## 5. NORMAS REVISTA SAÚDE PÚBLICA

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 1/11

**ISSN 0034-8910 versão impressa**

**ISSN 1518-8787 versão on-line**

### **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

#### **Categorias de Artigos**

São aceitos manuscritos nos idiomas: português, espanhol e inglês. O texto de manuscrito de pesquisa original deve seguir a estrutura conhecida como IMRD: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão ([Estrutura do Texto](#)). Manuscritos baseados em pesquisa qualitativa podem ter outros formatos, admitindo-se Resultados e Discussão em uma mesma seção e Considerações Finais/Conclusões. Outras categorias de manuscritos (revisões, comentários, etc.) seguem os formatos de texto a elas apropriados.

Os estudos devem ser apresentados de forma que qualquer pesquisador interessado possa reproduzir os resultados. Para isso estimulamos o uso das seguintes **recomendações**, de acordo com a categoria do manuscrito submetido:

- **CONSORT** checklist e fluxograma para ensaios controlados e randomizados
- **STARD** check list e fluxograma para estudos de acurácia diagnóstica
- **MOOSE** checklist e fluxograma para metanálises e revisões sistemáticas de estudos observacionais
- **PRISMA** checklist e fluxograma para revisões sistemáticas e metanálises
- **STROBE** checklist para estudos observacionais em epidemiologia
- **RATS** checklist para estudos qualitativos

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos de acordo com a [categoria de artigos](#)

#### **Categorias de artigos**

##### **a) Artigos Originais**

Incluem estudos observacionais, estudos experimentais ou quaseexperimentais, avaliação de programas, análises de custo-efetividade, análises de decisão e estudos sobre avaliação de desempenho de testes diagnósticos para triagem populacional. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

Incluem também ensaios teóricos (críticas e formulação de conhecimentos teóricos relevantes) e artigos dedicados à apresentação e discussão de aspectos metodológicos e técnicas utilizadas na pesquisa em saúde pública. Neste caso, o texto deve ser organizado em tópicos para guiar o leitor quanto aos elementos essenciais do argumento desenvolvido.

##### **Instrumentos de aferição em pesquisas populacionais**

Manuscritos abordando instrumentos de aferição podem incluir aspectos relativos ao desenvolvimento, a avaliação e à adaptação transcultural para uso em estudos populacionais, excluindo-se aqueles de aplicação clínica, que não se incluem no escopo da RSP.

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 2/11

Aos manuscritos de instrumentos de aferição, recomenda-se que seja apresentada uma apreciação detalhada do construto a ser avaliado,

incluindo seu possível gradiente de intensidade e suas eventuais subdimensões. O desenvolvimento de novo instrumento deve estar amparado em revisão de literatura, que identifique explicitamente a insuficiência de propostas prévias e justifique a necessidade de novo instrumental.

Deve ser detalhada a proposição, a seleção e a confecção dos itens, bem como o emprego de estratégias para adequá-los às definições do construto, incluindo o uso de técnicas qualitativas de pesquisa (entrevistas em profundidade, grupos focais etc.), reuniões com painéis de especialistas, entre outras. O trajeto percorrido na definição da forma de mensuração dos itens e a realização de pré-testes com seus conjuntos preliminares necessitam ser descritos no texto. A avaliação das validades de face, conteúdo, critério, construto e/ou dimensional deve ser apresentada em detalhe.

Análises de confiabilidade do instrumento também devem ser apresentadas e discutidas, incluindo-se medidas de consistência interna, confiabilidade teste-reteste e/ou concordância interobservador. Os autores devem expor o processo de seleção do instrumento final e situá-lo em perspectiva crítica e comparativa com outros instrumentos destinados a avaliar o mesmo construto ou construtos semelhantes.

Para os manuscritos sobre **adaptação transcultural** de instrumentos de aferição, além de atender, de forma geral, às recomendações supracitadas, faz-se necessário explicitar o modelo teórico norteador do processo. Os autores devem, igualmente, justificar a escolha de determinado instrumento para adaptação a um contexto sociocultural específico, com base em minuciosa revisão de literatura. Finalmente, devem indicar explicitamente quais e como foram seguidas as etapas do modelo teórico de adaptação no trabalho submetido para publicação.

Obs: O instrumento de aferição deve ser incluído como anexo dos artigos submetidos.

No preparo do manuscrito, além das [recomendações](#) citadas, verifique as instruções de formatação a seguir.

#### **Formatação:**

Devem conter até 3500 palavras (excluindo resumos, tabelas, figuras e referências).

Número de tabelas/figuras: até 5 no total.

Número de referências: até 30 no total.

Resumos no formato estruturado com até 300 palavras.

**b) Comunicações breves** – São relatos curtos de achados que apresentam interesse para a saúde pública, mas que não comportam uma análise mais abrangente e uma discussão de maior fôlego.

#### **Formatação:**

Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

Devem conter até 1500 palavras (excluindo resumos tabelas, figuras e referências)

Número de tabelas/figuras: uma tabela ou figura.

Número de referências: até 5 no total.

Resumos no formato narrativo com até 100 palavras.

#### **c) Artigos de revisão**

**Revisão sistemática e meta-análise** - Por meio da síntese de resultados de estudos originais, quantitativos ou qualitativos, objetiva

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 3/11

responder à pergunta específica e de relevância para a saúde pública. Descreve com pormenores o processo de busca dos estudos originais,



os critérios utilizados para seleção daqueles que foram incluídos na revisão e os procedimentos empregados na síntese dos resultados obtidos pelos estudos revisados. Consulte:

**MOOSE** checklist e fluxograma para metanálises e revisões sistemáticas de estudos observacionais

**PRISMA** checklist e fluxograma para revisões sistemáticas e metanálises

**Revisão narrativa/crítica** - A revisão narrativa ou revisão crítica apresenta caráter descritivo-discursivo, dedicando-se à apresentação compreensiva e à discussão de temas de interesse científico no campo da Saúde Pública. Deve apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teóricometodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Deve ser elaborada por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

**Formatação:**

Devem conter até 4000 palavras (excluindo resumos, tabelas, figuras e referências).

Número de tabelas/figuras: até 5 no total.

Número de referências: sem limites.

Resumos no formato estruturado com até 300 palavras, ou narrativo com até 150 palavras.

**d) Comentários**

Visam a estimular a discussão, introduzir o debate e "oxigenar" controvérsias sobre aspectos relevantes da saúde pública. O texto deve ser organizado em tópicos ou subitens destacando na Introdução o assunto e sua importância. As referências citadas devem dar sustentação aos principais aspectos abordados no artigo.

**Formatação:**

Devem conter até 2000 palavras (excluindo resumos, tabelas, figuras e referências).

Número de referências: até 30 no total.

Número de tabelas/figuras: até 5 no total.

Resumos no formato narrativo com até 150 palavras.

**Publicam-se também Cartas Ao Editor com até 600 palavras e até 5 referências.**

**Dados de Identificação do Manuscrito**

**Autoria**

O conceito de autoria está baseado na contribuição substancial de cada uma das pessoas listadas como autores, no que se refere sobretudo à concepção do projeto de pesquisa, análise e interpretação dos dados, redação e revisão crítica. A contribuição de cada um dos autores deve ser explicitada em declaração para esta finalidade. Não se justifica a inclusão de nome de autores cuja contribuição não se enquadre nos critérios acima.

**Dados de identificação dos autores (cadastro)**

**Nome e sobrenome:** O autor deve seguir o formato pelo qual já é indexado nas bases de dados.

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 4/11

**Correspondência:** Deve constar o nome e endereço do autor responsável para troca de correspondência.

**Instituição:** Podem ser incluídas até três hierarquias institucionais de afiliação (por exemplo: departamento, faculdade, universidade).

**Coautores:** Identificar os coautores do manuscrito pelo nome, sobrenome e instituição, conforme a ordem de autoria.

**Financiamento da pesquisa:** Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo

número do processo.

**Apresentação prévia:** Tendo sido apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

### **Conflito de Interesses**

Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada.

A confiabilidade pública no processo de revisão por pares e a credibilidade de artigos publicados dependem em parte de como os conflitos de interesses são administrados durante a redação, revisão por pares e tomada de decisões pelos editores.

Conflitos de interesses podem surgir quando autores, revisores ou editores possuem interesses que, aparentes ou não, podem influenciar a elaboração ou avaliação de manuscritos. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira.

Quando os autores submetem um manuscrito, eles são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado seu trabalho. Os autores devem reconhecer no manuscrito todo o apoio financeiro para o trabalho e outras conexões financeiras ou pessoais com relação à pesquisa. O relator deve revelar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influir em sua opinião sobre o manuscrito, e, quando couber, deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

Se os autores não tiverem certos do que pode constituir um potencial conflito de interesses, devem contatar a secretaria editorial da Revista.

### **Declaração de Documentos**

Em conformidade com as diretrizes do **International Committee of Medical Journal Editors**,

são solicitados alguns documentos e declarações do (s) autor (es) para a avaliação de seu

manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o

documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

#### **Documento/declaração Quem assina Quando anexar**

- a. **Carta de Apresentação** Todos os autores Na submissão
- b. **Declaração de responsabilidade** Todos os autores Na submissão
- c. **Responsabilidade pelos Agradecimentos** Autor responsável Após a aprovação
- d. **Transferência de Direitos Autorais** Todos os autores Após a aprovação

#### **a) CARTA DE APRESENTAÇÃO**

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 5/11

A carta deve ser assinada por todos os autores e deve conter:

Informações sobre os achados e conclusões mais importantes do manuscrito, esclarecendo

seu significado para a saúde pública.

Se os autores têm artigos publicados na linha de pesquisa do manuscrito, mencionar até três.

Declaração de responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte o site da RSP.

Declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.

Atestar a exclusividade da submissão do manuscrito à RSP.

Responder- Qual a novidade do seu estudo? Por que deve ser publicado nesta revista?

#### **b. DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE**

Segundo o critério de autoria do *International Committee of Medical Journal Editors*, autores devem contemplar todas as seguintes condições: (1) Contribuí substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; (2) Contribuí significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e (3) Participei da aprovação da versão final do manuscrito.

No caso de grupo grande ou multicêntrico ter desenvolvido o trabalho, o grupo deve identificar os indivíduos que aceitam a responsabilidade direta pelo manuscrito. Esses indivíduos devem contemplar totalmente os critérios para autoria definidos acima e os editores solicitarão a eles as declarações exigidas na submissão de manuscritos. O autor correspondente deve indicar claramente a forma de citação preferida para o nome do grupo e identificar seus membros. Normalmente serão listados no final do texto do artigo. Aquisição de financiamento, coleta de dados, ou supervisão geral de grupos de pesquisa, somente, não justificam autoria.

**Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar declaração de responsabilidade.**

Aquisição de financiamento, coleta de dados, ou supervisão geral de grupos de pesquisa, somente, não justificam autoria.

**Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar declaração de responsabilidade.**

### **c. AGRADECIMENTOS**

Devem ser mencionados os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados, etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

### **d. TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS**

Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RSP.

### **Preparo do Manuscrito**

#### **Título no idioma original do manuscrito e em inglês**

O título deve ser conciso e completo, contendo informações relevantes que possibilitem recuperação do artigo nas bases de dados. O limite é de 90 caracteres, incluindo espaços. Se o manuscrito for submetido em inglês, fornecer também o título em português.

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 6/11

#### **Título resumido**

Deve conter até 45 caracteres.

#### **Descritores**

Devem ser indicados entre 3 a 10, extraídos do vocabulário "**Descritores em Ciências da Saúde**" (**DeCS**), nos idiomas português, espanhol e inglês, com base no **Medical Subject Headings** (**MeSH**). Se não forem encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos livres (ou *key words*) mesmo não existentes nos vocabulários citados.

#### **Figuras e Tabelas**

Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos, etc.

#### **Resumo**

São publicados resumos em português, espanhol e inglês. Para fins de cadastro do manuscrito, deve-se apresentar dois resumos, um na língua original do manuscrito e outro em inglês (ou em português, em caso de manuscrito apresentado em inglês). As especificações quanto ao tipo de resumo estão descritas em cada uma das **categorias de artigos**. Como regra geral, o resumo deve incluir: objetivo do estudo,

principais procedimentos metodológicos (população em estudo, local e ano de realização, métodos observacionais e analíticos), principais resultados e conclusões.

### **Estrutura do texto**

*Introdução* – Deve ser curta, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, que deve estar explícito no final desta parte. Não devem ser mencionados resultados ou conclusões do estudo que está sendo apresentado.

*Métodos* – Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente; bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição quando necessária e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade; e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões éticos e aprovada por comitê de ética.

*Resultados* – Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados, nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise. Material extra ou suplementar e detalhes técnicos podem ser divulgados na versão eletrônica do artigo.

*Discussão* – A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho.

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores  
<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 7/11

As conclusões devem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho.

### **Referências**

*Listagem:* As referências devem ser normalizadas de acordo com o **estilo Vancouver - Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication**, ordenadas por ordem de citação. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o PubMed e grafados no formato itálico. No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina "et al". Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente. Sempre que possível incluir o DOI do documentado citado, de acordo com os exemplos a seguir.

### **Exemplos:**

#### **Artigos de periódicos**

Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Cienc*

*Saude Coletiva*. 2000;5(2):381-92. DOI:10.1590/S1413-8123200000200011

Zinn-Souza LC, Nagai R, Teixeira LR, Latorre MRDO, Roberts R, Cooper SP, et al. Fatores associados a sintomas depressivos em estudantes do ensino médio de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2008;42(1):34-40. DOI:10.1590/S0034-89102008000100005

### **Livros**

Wunsch Filho V, Koifman S. Tumores malignos relacionados com o trabalho. In: Mendes R, coordenador. *Patologia do trabalho*. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. v.2, p. 990-1040.

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press; 2001[citado 2003 jul 13]

Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=10149](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149)

Para outros exemplos recomendamos consultar as normas ("Citing Medicine") da National Library of Medicine, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

### **Citação no texto**

A referência deve ser indicada pelo seu número na listagem, na forma de **expoente** antes da pontuação no texto, sem uso de parênteses, colchetes ou similares. Nos casos em que a citação do nome do autor e ano for relevante, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por "e". Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de 'et al.' em caso de autoria múltipla).

### **Exemplos:**

A promoção da saúde da população tem como referência o artigo de Evans e Stoddart<sup>9</sup>, que considera a distribuição de renda, desenvolvimento social e reação individual na determinação dos processos de saúde-doença.

Segundo Lima et al.<sup>9</sup> (2006), a prevalência de transtornos mentais em estudantes de medicina é maior do que na população em geral.

### **Tabelas**

Devem ser apresentadas no final do texto, após as referências bibliográficas, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, 16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores <http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 8/11

na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

Para composição de uma tabela legível, o número máximo é de 10 colunas, dependendo da quantidade do conteúdo de cada casela. Notas em tabelas devem ser indicadas por letras e em sobrescrito.

### **Figuras**

As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) devem ser citadas como Figuras e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e apresentadas após as tabelas. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente

claras e com qualidade digital, preferentemente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Não se aceitam gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D). Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

### **Checklist para submissão**

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone.
2. Título do manuscrito, em português e inglês, com até 90 caracteres, incluindo os espaços entre as palavras.
3. Título resumido com 45 caracteres.
4. Texto apresentado em letras arial, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, docx e rtf).
5. Resumos estruturados para trabalhos originais de pesquisa em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
6. Resumos narrativos para manuscritos que não são de pesquisa em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
7. Carta de Apresentação, constando a responsabilidade de autoria e conflito de interesses, assinada por todos os autores.
8. Nome da agência financiadora e número (s) do (s) processo (s).
9. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas por ordem de citação, verificando se todas estão citadas no texto.
10. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, com no máximo 10 colunas.
11. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi; em se tratando de gráficos, devem estar sem linhas de grade e sem volume.
12. Tabelas e figuras não devem exceder a cinco, no conjunto.

### **Processo Editorial**

#### **a) Revisão da redação científica**

Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RSP se reserva o direito de fazer alterações visando a uma perfeita comunicação aos leitores. O autor responsável terá acesso a todas as modificações sugeridas até a última prova enviada. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

#### **b) Provas**

Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado por uma equipe que fará a revisão da redação científica (clareza, brevidade, objetividade e solidez), gramatical e de estilo.

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 9/11

O autor responsável pela correspondência receberá uma prova, em arquivo de texto (doc, docx ou rtf), com as observações/alterações feitas pela equipe de leitura técnica. O prazo para a revisão da prova é de dois dias.

Caso ainda haja dúvidas nessa prova, a equipe editorial entrará em contato para revisão, até que se chegue a uma versão final do texto. Em seguida, o texto final passará por uma revisão gramatical. Após essa revisão o autor receberá nova prova, no formato final para publicação. Nessa última revisão podem ser feitas apenas correções de erros, pois não serão admitidos mais ajustes de forma. O prazo para a revisão da prova final é de um dia.

Artigos submetidos em português ou espanhol serão vertidos para o inglês. Aproximadamente uma semana após o autor ter finalizado a prova do artigo, a RSP enviará a versão em inglês do artigo para apreciação do autor. Nesta revisão, o autor deverá atentar para



possíveis erros de interpretação, vocabulário da área e principalmente, equivalência de conteúdo com a versão "original aprovada". O prazo de revisão da versão em inglês é de dois dias.

A Revista adota o sistema de publicação continuada (*rolling pass*). Desta forma, a publicação do artigo se torna mais rápida: não depende de outros artigos para fechamento de um fascículo, mas do processo individual de cada artigo. Por isso, solicitamos o cumprimento dos prazos estipulados.

### **Taxa de Publicação**

Embora as revistas recebam subvenções de instituições públicas, estas não são suficientes para sua manutenção. Assim, a cobrança de taxa de publicação passou a ser alternativa para garantir os recursos necessários para produção da RSP.

A USP garante os recursos básicos, mas não são suficientes. Assim, temos que contar com recursos complementares, além das agências de fomento.

A RSP em 2016 completa 50 anos de publicação e somente em 2012 iniciou a cobrança de taxa de artigos, fato este imperioso para garantir sua continuidade, sobretudo permitindo-lhe evoluir com tecnologias mais avançadas, mas que exigem também maior qualidade e recursos tecnológicos.

O valor cobrado é avaliado regularmente. Assim, para os artigos submetidos a partir de **janeiro de 2017**, o valor da taxa será de 2.200,00 para artigo original, revisão e comentário, e de 1.500,00 para comunicação breve.

A RSP fornecerá aos autores os documentos necessários para comprovar o pagamento da taxa, perante instituições empregadoras, programas de pós-graduação ou órgãos de fomento à pesquisa.

### **Suplementos**

#### **a) CARTA DE APRESENTAÇÃO**

Cidade, \_\_\_[dia]\_\_\_ de Mês de Ano.

Prezado Sr. Editor, *Revista de Saúde Pública*

Submetemos à sua apreciação o trabalho

" \_\_\_\_\_ [título] \_\_\_\_\_", o qual se encaixa nas áreas de

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 10/11

interesse da RSP. A revista foi escolhida [colocar justificativa da escolha da revista para a publicação do manuscrito].

O autor 1 participou da concepção, planejamento, análise, interpretação e redação do trabalho; e, o autor 2 participou na interpretação e redação do trabalho. Ambos os autores aprovaram a versão final encaminhada.

O trabalho está sendo submetido exclusivamente à RSP. Os autores não possuem conflitos de interesse ao presente trabalho. (Se houver conflito, especificar).

\_\_\_\_\_  
nome completo do autor 1 + assinat ura

\_\_\_\_\_  
nome completo do autor 2 + assinatu ra

#### **b) DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE**

Eu, (nome por extenso), certifico que participei da autoria do manuscrito intitulado (título) nos seguintes termos:

"Certifico que participei suficientemente do trabalho para tornar pública minha responsabilidade pelo seu conteúdo. "

"Certifico que o manuscrito representa um trabalho original e que nem este manuscrito, em parte ou na íntegra, nem outro trabalho com conteúdo substancialmente similar, de minha autoria, foi publicado ou está sendo considerado para publicação em outra revista, quer seja no formato impresso ou no eletrônico, exceto o descrito em anexo. "

“Atesto que, se solicitado, fornecerei ou cooperarei totalmente na obtenção e fornecimento de dados sobre os quais o manuscrito está baseado, para exame dos editores. ”

Contribuição:

---

Local, data Assinatura

**c) DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE PELOS AGRADECIMENTOS**

Eu, (nome por extenso do autor responsável pela submissão), autor do manuscrito intitulado (título completo do artigo):

Certifico que todas as pessoas que tenham contribuído substancialmente à realização deste manuscrito, mas não preencheram os critérios de autoria, estão nomeados com suas contribuições específicas em Agradecimentos no manuscrito.

Certifico que todas as pessoas mencionadas nos Agradecimentos forneceram a respectiva permissão por escrito.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

16/11/2018 Rev. Saúde Públ. - Instruções aos autores

<http://www.scielo.br/revistas/rsp/pinstruc.htm> 11/11

DATA NOME COMPLETO E

ASSINATURA

**d) DECLARAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS**

Concordo que os direitos autorais referentes ao manuscrito [TÍTULO], aprovado para publicação na Revista de Saúde Pública, serão propriedade exclusiva da Faculdade de Saúde Pública, sendo possível sua reprodução, total ou parcial, em qualquer outro meio de divulgação, impresso ou eletrônico, desde que citada a fonte, conferindo os devidos créditos à Revista de Saúde Pública.

Autores:

\_\_\_\_\_  
Local, data NOME COMPLETO + Assinatura

\_\_\_\_\_  
Local, data NOME COMPLETO + Assinatura

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

***Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons***

**Avenida Dr. Arnaldo, 715**

**01246-904 São Paulo SP Bra sil**

**Tel./Fax: +55 11 3061-7985.**

[revsp@usp.br](mailto:revsp@usp.br)