

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade De Farmácia  
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Influência do meio de crescimento na detecção de carbapenemases pelos  
métodos Carba NP e Blue-Carba

Lizielli de Oliveira Ovalhe Bertodo

Porto Alegre, junho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade De Farmácia  
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Influência do meio de crescimento na detecção de carbapenemases pelos  
métodos Carba NP e Blue-Carba

Lizielli de Oliveira Ovalhe Bertodo

Prof. Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas  
Orientadora

Prof. Dr. Afonso Luís Barth  
Coorientador

Porto Alegre, junho de 2016.

Este trabalho foi escrito segundo as normas da revista "Clinical and Biomedical Research" (CBR), apresentadas em anexo.

# INFLUÊNCIA DO MEIO DE CRESCIMENTO NA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES PELOS MÉTODOS CARBA NP E BLUE-CARBA

## *INFLUENCE OF ISOLATION MEDIUM ON CARBA NP AND BLUE-CARBA METHODS FOR CARBAPENEMASE DETECTION*

Lizielli de Oliveira Ovalhe Bertodo<sup>1</sup>, Ana Lucia Peixoto de Freitas<sup>1,2</sup>, Afonso Luís Barth<sup>1,2</sup>

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

### RESUMO

**Introdução:** A detecção rápida de carbapenemases auxilia no tratamento do paciente e medidas de controle de infecção mais eficazes. Duas metodologias fenotípicas rápidas e de baixo custo, Carba NP e Blue-Carba, foram descritas para a detecção dessas enzimas. O objetivo desse trabalho é avaliar a leitura e interpretação desses testes quando realizados a partir de colônias isoladas nos meios MacConkey e Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED), comparando com os resultados obtidos com crescimento em Mueller-Hinton. **Métodos:** Um total de 35 isolados produtores de carbapenemases, previamente identificados por RT-PCR multiplex, foram testados para Carba NP e Blue-Carba. Em paralelo realizou-se teste com EDTA para avaliar a presença de metalo- $\beta$ -lactamases.

**Resultados:** Nos testes Carba NP os resultados de isolados em MacConkey foram adequados em 57,6 % dos casos quando incubados pelo tempo preconizado e em CLED apenas 22,9 %. Na maioria dos testes Blue-Carba o resultado foi não interpretável; apenas 5 isolados do MacConkey e somente um 1 isolado do CLED forneceram resultados adequados.

**Discussão:** Somente leitura em maior tempo de incubação forneceu resultados satisfatórios para Carba NP. Nos testes Blue-Carba a alteração imediata da coloração dos poços dos controles negativos da maioria dos isolados impediu a interpretação. Acredita-se que esses resultados possam estar associados ao acúmulo de ácido láctico nos isolados lactose positivo.

**Conclusão:** Não recomendamos realizar os testes Carba NP e Blue-Carba com colônias crescidas em MacConkey e CLED tanto pela inadequação do tempo de leitura recomendado no primeiro como pela dificuldade de interpretação no segundo.

**Palavras-chave:** *Carbapenêmicos, Carbapenemases, Blue-Carba, Carba NP, MacConkey, CLED*

### ABSTRACT

**Introduction:** The rapid detection of carbapenemases improve a more effective treatment of the patient and control infection measures. Two low-cost and quick phenotypic methods, Carba NP and Blue-Carba, has been described in order to detect these enzymes. The present work aims to evaluate the interpretation of these tests when carried out from isolated colonies on MacConkey and Cystine Lactose Electrolyte Deficient agar (CLED), comparing with the results obtained from Muller-Hinton agar.

**Methods:** A total of 35 carbapenemase-producing isolates previously identified through RT-PCR multiplex have been tested for Carba NP and BlueCarba. Simultaneously, tests containing EDTA tests has been performed in order to evaluate the presence of metallo- $\beta$ -lactamases.

**Results:** The results from MacConkey were suitable in 57.6% of the cases after incubation for the standard period of 2h, whereas only 22.9% were satisfactory from CLED isolates. It was not possible to evaluate the great majority of the results from the Blue-Carba test, only five isolates from MacConkey and one from CLED presented proper results.

**Discussion:** Suitable results were obtained with longer incubation period in Carba NP. In the Blue-Carba tests, the immediate color changing in the negative control well prevented interpretation of the results, and this can be associated with accumulation of lactic acid in lactose positive isolates .

**Conclusion:** We hence do not encourage performing both Carba NP and Blue-Carba tests with colonies from MacConkey and CLED medium, since the first test does not provide a suitable time to obtain the results, as well as the second one faces difficulties regarding interpretation.

**Keywords:** *Carbapenem, Carbapenemases, Blue-Carba, Carba NP, MacConkey, CLED*

## INTRODUÇÃO

A produção de enzimas, em particular as  $\beta$ -lactamases, constitui o principal mecanismo de resistência em enterobactérias. As carbapenemases são as  $\beta$ -lactamases de maior relevância clínica entre os bacilos Gram negativos, considerando que o alto poder hidrolítico de algumas dessas enzimas faz com que os isolados produtores sejam resistentes não somente aos carbapenêmicos, mas a todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos<sup>1</sup>.

De acordo com Ambler<sup>2</sup>, as carbapenemases são classificadas, de acordo com a estrutura molecular, em três classes: A, B e D. Na classe A estão presentes as penicilinases: *Klebsiella pneumoniae*-Carbapenemase e Guiana  $\beta$ -lactamase de Espectro Estendido (KPC e GES) e na classe D, as oxacilinases (OXA-48), ambas classes são serino- $\beta$ -lactamases (possuem um aminoácido serina no centro ativo). As enzimas da classe B compreendem as metalo- $\beta$ -lactamases: New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase, Imipenemase e Verona Imipenemase (NDM, IMP e VIM) as quais são dependentes de zinco ( $Zn^{2+}$ ), como cofator para a atividade enzimática.

Os pacientes infectados ou colonizados por isolados resistentes aos carbapenêmicos são difíceis de tratar e tendem a ter uma estadia prolongada em hospitais. Sabe-se que o sucesso do tratamento destas infecções está diretamente ligado à rapidez do diagnóstico e administração do antibiótico adequado<sup>3</sup>. Para isso a utilização de metodologias rápidas e de baixo custo para a detecção de carbapenemases é essencial para o correto manejo do paciente e para implementação de medidas de controle de infecção.

Uma vez detectada sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos pelos testes de sensibilidade de rotina, os métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases devem ser aplicados. Durante muitos anos, o Teste de Hodge modificação foi considerado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como método fenotípico de detecção para carbapenemases, sendo amplamente utilizado em laboratórios de diagnóstico<sup>4</sup>. Além de ser um método demorado, também tem baixa sensibilidade e especificidade, principalmente para detecção de NDM, não sendo mais recomendado para detecção de carbapenemases, segundo a Nota Técnica nº 01/2013 da ANVISA<sup>5</sup>. Atualmente é preconizado o teste do disco combinado baseado no uso de bloqueadores enzimáticos, sendo que o ácido fenilborônico inibe carbapenemases da classe A e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) inibe carbapenemases classe B. Não há nenhum inibidor atualmente disponível para carbapenemases classe D<sup>5,6</sup>. O método padrão-ouro para detecção de carbapenemases é o teste genotípico, incluindo PCR e sequenciamento de DNA. Estas metodologias apresentam grande sensibilidade e especificidade, mas tem custo elevado quando comparadas com os métodos fenotípicos. Além disso, os métodos genotípicos são mais demorados e têm a desvantagem de não serem capazes de identificar novas variantes de  $\beta$ -lactamases<sup>7</sup>.

Duas metodologias fenotípicas mais rápidas e de baixo custo (Carba NP e Blue-Carba) foram recentemente descritas para a detecção de carbapenemases e baseiam-se na acidificação do pH devido à hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, presentes nos carbapenêmicos, que é detectada por um indicador de pH. O Carba NP, a primeira metodologia descrita<sup>8</sup>, utiliza o vermelho de fenol como indicador de pH. Esta metodologia já está incluída nas orientações para a detecção de mecanismos de resistência do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)<sup>6</sup> e no documento M100-S25 do CLSI<sup>9</sup> como método de triagem para detecção de carbapenemases. A outra metodologia, o Blue-Carba, utiliza o azul de bromotimol como indicador de pH e tem metodologia mais simples por ter uma etapa a menos que o Carba NP<sup>10</sup>.

Considerando que a rápida detecção de carbapenemases tem grande impacto na adequação do tratamento do paciente infectado bem como na implantação de medidas de controle de disseminação de bactérias resistentes, esse trabalho tem como objetivo avaliar a leitura e interpretação dos testes Carba NP e Blue-Carba realizados a partir de colônias isoladas em ágar MacConkey e ágar Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED), amplamente utilizados para semeadura primária de enterobactérias visto que a alteração de pH e coloração da colônia, devido a utilização da lactose são potenciais interferentes nestes testes.

## MÉTODOS

Foram utilizados isolados de um estudo de vigilância epidemiológica para monitoramento de enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos de amostras clínicas do período de abril/2013 a abril/2015 (estudo aprovado pelo GPPG do HCPA Nº 130469). Os isolados bacterianos foram submetidos à extração de DNA e a detecção dos principais genes de carbapenemases (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*) foi realizada por RT-PCR multiplex conforme a técnica descrita por Monteiro e colaboradores<sup>11</sup>. Foram selecionados 35 isolados com resultados positivos (19 KPC, 7 NDM, 4 OXA-48, 2 IMP, 2 GES e 1 VIM). Para avaliar a adequação de utilizar colônias a partir de meios

indicadores, foram comparados resultados obtidos com colônias semeadas em ágar Mueller-Hinton (meio de cultura preconizado para realização dos testes), ágar MacConkey e ágar CLED, incubados por 18h-24h a 37°C. As colônias isoladas em cada um dos meios foram testadas em Carba NP e Blue-Carba, com imipenem como substrato. Ambos os testes são baseados na acidificação decorrente da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico do imipenem, revelada pela mudança de coloração do indicador de pH, respectivamente vermelho de fenol e azul de bromotimol.

O teste de Carba NP foi realizado em microplacas conforme descrito por Nordmann e colaboradores<sup>8</sup>. Resumidamente, as colônias foram submetidas a uma extração usando tampão de lise B-PERII (*Bacterial Protein Extraction Reagent*). Para cada isolado, o extrato de enzimático foi incubado com uma solução de vermelho de fenol e imipenem. O teste foi considerado positivo quando houve acidificação da solução, isto é qualquer alteração de cor de vermelho para laranja ou amarelo. Para ajudar a interpretação das cores, foi feito um controle negativo sem antibiótico para cada isolado.

O teste Blue-Carba foi realizado como descrito por Pires e colaboradores<sup>10</sup> e tem como principal diferença o fato de não ser necessária a etapa de extração enzimática. O teste foi considerado positivo se a cor, inicialmente azul, da solução de teste muda para verde ou amarelo, devido a acidificação do pH. Esta metodologia também utiliza um controle negativo para cada isolado testado.

As duas metodologias (Carba NP e Blue-Carba) foram avaliadas depois de 2 horas de incubação em estufa bacteriológica, com leituras nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos.

Em paralelo foi realizado um teste com EDTA como inibidor de carbapenemases da Classe B<sup>12</sup>. Este teste foi realizado junto as metodologias originais descritas acima e interpretado somente nos isolados carbapenemase positivos. Neste caso, o teste negativo (quando não há viragem de cor) indica a inibição da enzima pelo EDTA, ou seja, uma metalo- $\beta$ -lactamases.

## RESULTADOS

**Teste Carba NP.** O teste realizado com colônias crescidas em Mueller-Hinton forneceu resultados compatíveis aos esperados (alteração de cor) para 82,9 % dos isolados testados, tanto nos testes para carbapenemase como nos com EDTA para de detecção de metalo- $\beta$ -lactamases. Houve resultados falso-negativos em 4 isolados com gene OXA-48 e 2 isolados GES. Nos testes realizados com colônias provenientes do meio MacConkey e do meio CLED foi necessário maior tempo de incubação para positividade; após 2 horas de incubação 57,6 % foram positivos nos testes a partir de MacConkey e apenas 22,9 % a partir do CLED. Após 16 horas de incubação todos os testes tiveram resultados correspondentes ao esperado. Do mesmo modo foi necessário maior tempo de incubação nos testes com EDTA.

**Teste Blue-Carba.** Os testes com bactérias crescidas em Mueller-Hinton revelaram resultados compatíveis com os esperados para 94,3 % dos isolados o que também ocorreu nos poços com EDTA, havendo alteração ou não de cor conforme o tipo de carbapenemase. Houve resultado falso-negativo em 1 isolado com gene OXA-48 e 1 isolado GES. Os testes com colônias a partir do meio de MacConkey e CLED mostraram problemas pois correu alteração na coloração de alguns poços imediatamente após colocação da bactéria mesmo nos controles negativos, o que impediu correta interpretação de resultados. A leitura foi feita somente após 2 horas de incubação, não tendo sido observadas mudanças significativas mesmo após 16 horas de incubação. Assim, não foi possível interpretar a maioria dos testes. Também nos testes que puderam ser interpretados (não houve alteração de cor no controle negativo), os resultados mostram bastante desacordo.

A partir do crescimento em MacConkey apenas 5 amostras carbapenemase positivas forneceram resultados adequados para o controle negativo e para os testes. Esses isolados foram caracterizados como KPC, sendo que 4 deles apresentaram colônias lactose positiva e 1 colônias lactose negativa. Outros 2 isolados carbapenemase positivo, um OXA-48 e outro GES, embora com controle negativo adequado forneceram resultado falso-negativo: não houve mudança de coloração no poço do teste em 2 horas de incubação. As outras 28 amostras, 80% dos isolados positivos, mostraram resultados não interpretáveis devido a mudança na coloração do controle negativo (Tabela 1).

A partir do crescimento em CLED, apenas 1 isolado forneceu resultado adequado para controle negativo e para os testes. Esse único isolado NDM tinha colônias lactose negativa. Outro isolado OXA-48 manteve a cor do controle negativo adequada, mas apresentou resultado falso-negativo. Os outros 33 isolados (94,3%) revelaram resultados não interpretáveis pois também houve mudança na coloração do controle negativo (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

A maioria dos estudos não utiliza meios seletivos e indicadores para realização dos testes Carba NP e Blue-Carba, embora estes sejam muitas vezes meios de semeadura primária no laboratório de microbiologia clínica. Sendo assim, a rapidez do teste também está relacionada a possibilidade de utilizar colônias crescidas nestes meios. Muitas vezes, a pesquisa de enzimas como carbapenemases só é realizada em isolados suspeitos (isolados com baixa sensibilidade aos carbapenêmicos), no entanto, em locais com alta prevalência de carbapenemases, consideramos importante a possibilidade de realizar estes testes rápidos a partir do crescimento em meio de semeadura primária, que muitas vezes são meios indicadores como o ágar MacConkey ou o ágar CLED. Deste modo os resultados estariam disponíveis antes mesmo dos testes de sensibilidade, podendo guiar tanto o tratamento do paciente como auxiliar nas medidas de Controle de Infecção Hospitalar.

Os resultados obtidos para os testes Carba NP e Blue-Carba realizados com colônias crescidas em ágar Mueller-Hinton já eram esperados. Não houve concordância com o PCR para isolados OXA-48 e GES, e já foi relatado que enzimas com menor poder hidrolítico podem fornecer resultados falso-negativos<sup>13,14</sup>. Também está descrito que falso-negativos podem estar associados a cepas que apresentam colônias mucoides<sup>14</sup>, o que não foi observado neste trabalho, embora vários isolados com este fenótipo tenham sido testados. Por outro lado, nos isolados KPC e Metallo- $\beta$ -Lactamases, enzimas que são altamente hidrolíticas, os resultados foram satisfatórios: em 2 horas foi possível identificar a presença de carbapenemase e se essa era ou não uma Metallo- $\beta$ -Lactamases através do teste com EDTA em todas as amostras.

Os resultados do teste Carba NP feito com colônias crescidas em ágar MacConkey e em ágar CLED mostraram grande discrepância quando a leitura foi realizada em 2 horas, como é recomendado na técnica. Leituras em maior tempo de incubação (após 16 horas) revelaram resultados satisfatórios. Importa saber se este tempo altera a característica de rapidez do teste, avaliando o impacto do aumento de tempo para obtenção de resultados adequados na rotina laboratorial e para tratamento do paciente. Esta discrepância pode estar relacionada a alteração de cor que ocorre nas bactérias fermentadoras da lactose, gerando colônias rosa no MacConkey e amarelas no CLED, mas principalmente devido ao pH ácido destas colônias. Em relação ao uso de meios seletivos para Gram negativos, Dortet e colaboradores<sup>15</sup> relataram em um estudo testando Carba NP com amostras crescidas em ágar Drigalski e ágar MacConkey que o teste foi interpretável apenas para 63% e 71% dos isolados, respectivamente e associou os resultados como consequência do acúmulo de ácido láctico nos isolados bacterianos capazes de fermentar a lactose. Comparando com os resultados por nós obtidos após 2 horas de incubação e com bactérias crescidas em MacConkey ou CLED (com composição e indicador de pH semelhante ao ágar Drigalki) observamos concordância, confirmando que testes com colônias crescidas que meios seletivos com indicador para lactose não podem ser usados para o teste Carba NP pois não fornecem resultados adequados, pelo menos no tempo preconizado do teste.

Os resultados do teste Blue-Carba, com colônias do ágar MacConkey e em ágar CLED, mostraram grande discrepância já no momento de inoculação dos isolados nos poços, com alteração imediata da cor dos poços dos controles negativos. Do mesmo modo que para o Carba NP, esses resultados podem estar associados ao acúmulo de ácido láctico nos isolados capazes de fermentar a lactose. Além disso, as colônias mucoides<sup>14</sup> e outras variáveis podem estar interferindo nos resultados. Em estudo recente de Pires e colaboradores<sup>16</sup> foram avaliadas diversas fontes potenciais de erro durante a execução dos testes Carba NP e Blue-Carba como a falta de padronização do inóculo, homogeneização inadequada do inóculo nas soluções de teste e o armazenamento impróprio dos reagentes de teste (especialmente imipenem). Neste sentido cabe ressaltar que em nosso trabalho as soluções de teste do Blue-Carba foram testadas com colônias crescidas em Mueller-Hinton, MacConkey e CLED; assim, como os testes do Mueller-Hinton funcionaram, a possibilidade de contaminação da solução ou de degradação do imipenem foi descartada.

Este estudo mostrou que os testes Carba NP e Blue-Carba, considerados métodos rápidos, de fácil execução e de custo baixo só apresentam resultados confiáveis quando realizados a partir de colônias crescidas em ágar Mueller-Hinton. Mesmo neste caso pode haver resultados falso-negativos para enzimas com baixo poder hidrolítico aos carbapenêmicos, o que deve ser levado em consideração, e pode inviabilizar o teste em locais onde cepas com esta característica são endêmicas. Além disso verificamos que a realização destes testes com colônias crescidas em ágar MacConkey e CLED são inadequados; no teste de Carba NP o tempo de leitura preconizado pelas técnicas originais mostrou resultados falso-negativos; e no teste Blue-Carba a maioria dos resultados não pode ser interpretada. Em conclusão não é recomendado realizar testes Carba NP e Blue-Carba a partir de colônias crescidas em meios indicadores.

## REFERÊNCIAS

1. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–458
2. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamase. *Philos Trans Royal Soc Lon.;Ser B;Biol Sci.* 1980;289(36):321-331.
3. Lee C, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):4274-4305.
4. Girlich D, Poirel L, Nordman P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):477-479.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica nº 1/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Brasília (DF), BR: ANVISA; 2013.
6. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. São Paulo, BR: BrCAST, 2015.
7. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):432–438.
8. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-1507
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement . CLSI M100-S25. Wayne, PA: CLSI, 2012.
10. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281–4283.
11. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):906-909
12. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by Using a Biochemical Test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437–6440.
13. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-1798.
14. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4578–4580.
15. Dortet L, Brécharde L, Poirel L, Nordmann P. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test. *J Medical Microbiol.* 2014;63(5):772-776.
16. Pires J, Tinguely R, Thomas B, Luzzaro F, Endimiani A. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2016;122:33-37.



**Tabela 1.** Resultados do teste Blue-Carba a partir de isolados crescidos em ágar MacConkey.

Isolado	Carbapenemase	n	Lactose	2 horas		
				C	T	MβL
<i>E. coli</i>	KPC	1	LAC +	A	P	N
<i>Citrobacter freundii</i>	KPC	1	LAC +	A	P	N
<i>Serratia sp.</i>	KPC	1	LAC -	A	P	N
<i>K. pneumoniae</i>	KPC	2	LAC +	A	P	N
<i>E. coli</i>	KPC	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>Enterobacter sp.</i>	KPC	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	KPC	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	KPC	10	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	OXA-48	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	OXA-48	1	LAC +	A	N	NI
<i>E. coli</i>	OXA-48	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>S. marcescens</i>	GES	1	LAC -	A	N	NI
<i>K. pneumoniae</i>	GES	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. coli</i>	NDM	1	LAC -	NA	NI	NI
<i>Providencia rettgeri</i>	NDM	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	NDM	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>K. oxytoca</i>	NDM	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	NDM	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	VIM	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	IMP	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	IMP	1	LAC -	NA	NI	NI

C, controle negativo; T, Teste para carbapenemase; MβL, Teste para metalo-β-lactamase; A, adequado; NA, não adequado; P, positivo; N, negativo; NI, não interpretável.

**Tabela 2.** Resultados do teste Blue-Carba a partir de isolados crescidos em ágar CLED.

Isolado	Carbapenemase	n	Lactose	2 horas		
				C	T	MβL
<i>E. coli</i>	KPC	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>Citrobacter freundii</i>	KPC	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>Serratia sp.</i>	KPC	1	LAC -	NA	NI	NI
<i>Enterobacter sp.</i>	KPC	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	KPC	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	KPC	11	LAC+	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	KPC	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. coli</i>	OXA-48	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	OXA-48	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	OXA-48	1	LAC -	A	N	NI
<i>S. marcescens</i>	GES	1	LAC -	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	GES	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. coli</i>	NDM	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>Providencia rettgeri</i>	NDM	1	LAC -	A	P	P
<i>K. pneumoniae</i>	NDM	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>K. oxytoca</i>	NDM	2	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	NDM	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	VIM	1	LAC +	NA	NI	NI
<i>E. cloacae complex</i>	IMP	1	LAC -	NA	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	IMP	1	LAC +	NA	NI	NI

C, controle negativo; T, Teste para carbapenemase; MβL, Teste para metalo-β-lactamase; A, adequado; NA, não adequado; P, positivo; N, negativo; NI, não interpretável.

## **Instruções aos Autores**

### **Escopo e política**

A Clinical and Biomedical Research (CBR), antiga Revista HCPA, é uma publicação científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). É um periódico científico de acesso livre que tem a finalidade de publicar trabalhos de todas as áreas relevantes das Ciências da Saúde, incluindo pesquisa clínica e básica. Os critérios de seleção para publicação incluem: originalidade, relevância do tema, qualidade metodológica e adequação às normas editoriais da revista.

A CBR apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [[http://www.icmje.org/clin\\_trial.pdf](http://www.icmje.org/clin_trial.pdf)]. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido número de identificação do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) <http://www.ensaiosclinicos.gov.br> ou de outro banco de dados oficial dedicados ao registro de ensaios clínicos.

Todos os artigos publicados são revisados por pares anônimos. Uma vez que o artigo seja aceito para publicação, os seus direitos autorais são automaticamente transferidos para a revista. O conteúdo do material enviado para publicação na CBR implica que o mesmo não tenha sido publicado e não esteja submetido a outra revista. Artigos publicados na CBR, para serem publicados em outras revistas, ainda que parcialmente, necessitarão de aprovação por escrito dos editores. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de total responsabilidade dos autores. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. As submissões em inglês são fortemente encorajadas pelos editores.

O manuscrito deve enquadrar-se em uma das diferentes categorias de artigos publicados pela revista, conforme a seguir:

### **Forma e preparação de artigos**

#### **SERÃO CONSIDERADOS PARA PUBLICAÇÃO**

##### **Editorial**

Comentário crítico e aprofundado, preparado a convite dos editores e submetido por pessoa com notório saber sobre o assunto abordado. Os editoriais podem conter até 1000 palavras. Esta seção pode incluir o editorial de apresentação da Revista, assinado pelo Editor, além de editoriais especiais, que compreendem colaborações solicitadas sobre temas atuais ou artigos publicados na Revista.

##### **Artigos de Revisão**

Artigos que objetivam sintetizar e avaliar criticamente os conhecimentos disponíveis sobre determinado tema. Devem conter até 6.000 palavras. Esses artigos devem apresentar resumo, não estruturado com número não superior a 200 palavras (exceto revisões sistemáticas – ver estrutura de resumo em ‘Artigos Originais’) e uma lista abrangente, mas preferencialmente não superior a 80 referências.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

## **Artigos Especiais**

Manuscritos exclusivamente solicitados pelos editores, sobre tema de relevância científica, a autores com reconhecida expertise na área e que não se enquadrem nos critérios de Editorial.

## **Artigos Originais**

Artigos com resultados inéditos de pesquisa, constituindo trabalhos completos que contêm todas as informações relevantes que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A sua estrutura formal deve apresentar os tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. A(s) conclusão(ões) deve(m) estar no último parágrafo da Discussão, não sendo necessária uma seção específica. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas. Para os artigos originais, deve-se apresentar um resumo estruturado (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) em português e em inglês (Abstract), nos casos em que o artigo não for escrito na sua totalidade na língua inglesa. O Resumo e o Abstract não devem exceder 250 palavras.

Os artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

## **Relatos de Casos**

São artigos baseados em casos peculiares e comentários sucintos sobre a importância do caso em relação ao conhecimento atual na área. Devem conter até 1.000 palavras, com um total de, no máximo, duas tabelas ou figuras e 15 referências, já que o objetivo dos relatos não é apresentar uma revisão bibliográfica.

A sua estrutura deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, explicando a relevância do caso; Apresentação do caso (Relato do Caso) e Discussão. Os relatos de casos devem descrever achados novos ou pouco usuais, ou oferecer novas percepções sobre um problema estabelecido. O conteúdo deve limitar-se a fatos pertinentes aos casos. O sigilo em relação à identificação dos pacientes é fundamental, não devendo ser relatadas datas precisas, iniciais ou qualquer outra informação não relevante ao caso, mas que eventualmente possa identificar o paciente. Os Relatos de Caso devem ter Resumo não estruturado com no máximo 150 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

## **Relatos de Casos: Imagens em Medicina**

Seção destinada à publicação de Imagens elucidativas, não usuais e/ou de amplo interesse de situações médicas. Deve conter até 500 palavras e um total de 5 referências. Duas a três imagens (resolução mínima de 300 dpi).

## **Cartas**

Opiniões e comentários sobre artigo publicado na Revista, sobre temas de relevância científica e/ou observações clínicas preliminares. O texto deve ser breve com, no máximo, 500 palavras. Apenas uma tabela e uma figura são permitidas e, no máximo, cinco referências. Não devem ter resumo.

## **Comunicações Breves**

Comunicações breves são resultados preliminares de pesquisas originais ou estudos mais pontuais que contêm todas as informações relevantes para que o leitor possa avaliar os seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A estrutura é semelhante a artigos originais; no entanto, o resumo (Português, Espanhol, ou Inglês) não deve exceder 150 palavras e o texto não deve exceder 1.200 palavras. Ter no máximo duas Tabelas ou Figuras.

## **Suplementos**

Além dos números regulares, a CBR publica o suplemento da Semana Científica do HCPA.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Conflitos de interesse surgem quando o autor tem relações pessoais ou financeiras que influenciam seu julgamento. Estas relações podem criar tendências favoráveis ou desfavoráveis a um trabalho e prejudicar a objetividade da análise. Os autores devem informar sobre possíveis conflitos de interesse. Isso se estende para editoriais e artigos de revisão, e deve ser feito na ocasião do envio do manuscrito. Cabe ao editor decidir se esta informação deve ou não ser publicada e usá-la para tomar decisões editoriais. Uma forma comum de conflito de interesse é o financiamento de trabalhos de pesquisa por terceiros, que podem ser empresas, órgãos públicos ou outros. Esta obrigação para com a entidade financiadora pode levar o pesquisador a obter resultados que a satisfaçam, tornando o estudo tendencioso. Autores devem descrever a interferência do financiador em qualquer etapa do estudo, bem como a forma de financiamento e o tipo de relacionamento estabelecido entre patrocinador e autor. Os autores podem optar por informar nomes de pareceristas para os quais seu artigo não deva ser enviado, justificando-se.

## **PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE**

Informações e imagens de pacientes que permitam sua identificação só devem ser publicadas com autorização formal e por escrito do paciente, e apenas quando necessárias ao objetivo do estudo. Para a autorização formal, o paciente deve conhecer o conteúdo do artigo e ter ciência de que este artigo poderá ser disponibilizado na internet. Em caso de dúvida sobre a possibilidade de identificação de um paciente, como fotos com tarjas sobre os olhos, deve ser obtida a autorização formal. No caso de distorção de dados para evitar identificação, autores e editores devem assegurar-se de que tais distorções não comprometam os resultados do estudo.

## **EXPERIÊNCIAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS**

Toda matéria relacionada com pesquisa em seres humanos e pesquisa em animais deve ter aprovação prévia de Comitê de Ética em Pesquisa ou Comissão de Ética no uso de animais, respectivamente. Os trabalhos deverão estar de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque (vigente ou atualizada), das Resoluções CNS 196/96 e complementares e da Lei 11.794/2008 para estudos em animais. É importante indicar o número do registro do projeto no respectivo Comitê ou Comissão de Ética, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, se aplicável.

## PREPARO DO ARTIGO

O cadastro no sistema e posterior acesso ou login são obrigatórios para submissão e verificação do estágio das submissões.

**Identificação:** devem constar: a) Título do artigo, que deve ser claro e conciso. Não usar abreviaturas. Deve-se apresentar a versão do título reduzido para constar no cabeçalho e título no idioma inglês; b) nome completo dos autores; c) instituição e o setor ou unidade da instituição a que cada autor está filiado (títulos pessoais e cargos ocupados não deverão ser indicados); d) nome da instituição onde o trabalho foi realizado; e) indicação do autor responsável pela correspondência, acompanhada do endereço completo; e f) se tiver sido apresentado em reunião científica, deve-se indicar o nome do evento, o local e a data da realização.

### TODOS OS NOMES DOS AUTORES INCLUÍDOS NO MANUSCRITO DEVEM SER CADASTRADOS NO SISTEMA

**Resumo e Palavras-chave:** os artigos devem conter o resumo em português e em inglês. Verificar a estrutura e o número máximo de palavras conforme descrito para cada tipo de artigo específico (ver anteriormente). Os resumos estruturados, exigidos apenas para os artigos originais, devem apresentar, no início de cada parágrafo, o nome das subdivisões que compõem a estrutura formal do artigo (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões). As palavras-chave, expressões que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de 3 a 10, fornecidas pelo autor, baseando-se no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme, que é uma tradução do MeSH (Medical Subject Headings) da National Library of Medicine, disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>. As palavras-chave devem ser apresentadas em português e em inglês.

**Manuscrito:** deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. Citações no texto e as referências citadas nas legendas das tabelas e das figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos. As referências devem ser citadas no texto sobrescritas, conforme o exemplo: Texto<sup>1</sup>. texto<sup>1-3</sup>, texto<sup>4,6,9</sup>.

**Tabelas:** devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e encabeçadas por um título apropriado. Devem ser citadas no texto, mas deve-se evitar a duplicação de informação. As tabelas, com seus títulos e rodapés, devem ser autoexplicativas. As abreviações devem ser especificadas como nota de rodapé sem indicação numérica. As demais notas de rodapé deverão ser feitas em algarismos arábicos e sobrescritas.

**Figuras e gráficos:** as ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) devem ser enviadas em arquivos separados, em formato JPG (em alta resolução – no mínimo, 300 dpi). Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e serem suficientemente claras para permitir sua reprodução e estarem no mesmo idioma do texto. Não serão aceitas fotocópias. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar a permissão, por escrito, para a sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos submetidos à publicação. As figuras devem possuir um título e legenda (se necessário). Ambos devem preceder a figura propriamente dita.

**Abreviações:** as abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. No restante do artigo, não é necessário repetir o nome por extenso.

**Nome de medicamentos:** deve-se usar o nome genérico.

**Havendo citação de aparelhos/equipamentos:** todos os aparelhos/equipamentos citados devem incluir modelo, nome do fabricante, estado e país de fabricação.

**Agradecimentos:** devem incluir a colaboração de pessoas, grupos ou instituições que tenham colaborado para a realização do estudo, mas cuja contribuição não justifique suas inclusões como autores; neste item devem ser incluídos também os agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico, etc. Devem vir antes das referências bibliográficas.

**Conflitos de interesse:** Caso haja algum conflito de interesse (ver anteriormente) o mesmo deve ser declarado. Caso não haja, colocar nesta seção: “Os autores declaram não haver conflito de interesse”

**Referências:** devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com algarismos arábicos. A apresentação deverá estar baseada no formato denominado “*Vancouver Style*”, conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine e disponibilizados no endereço: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências e apenas citados no texto. Caso entendam necessário, os editores podem solicitar a apresentação de trabalhos não publicados citados no manuscrito.

#### **Exemplos de citação de referências:**

##### **Artigos de periódicos (de um até seis autores)**

Almeida OP. Autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

##### **Artigos de periódicos (mais de seis autores)**

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

##### **Artigos sem nome do autor**

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

##### **Livros no todo**

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

##### **Capítulos de livro**

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

### **Livros em que editores (organizadores) são autores**

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

### **Teses**

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

### **Trabalhos apresentados em congressos**

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland;1992. p. 1561-5.

### **Artigo de periódico em formato eletrônico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: [URL:http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm).

### **Outros tipos de referência deverão seguir o documento**

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

### **Requisitos técnicos**

Arquivo word (doc ou .rtf), digitado em espaço simples, fonte tamanho 10, margem de 2 cm de cada lado, página de título, resumo e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas e as imagens enviadas em formato jpg ou tiff com resolução mínima de 300dpi.

*8 jan 2016*