



EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 7.3.1 – janeiro 2017

Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras

Autores:

M.C.Arendrup, J. Meletiadis, J. W. Mouton, K. Lagrou, Petr Hamal, J Guinea e o Subcomitê de Teste de Sensibilidade aos Antifúngicos (*Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing -AFST*) do Comitê Europeu para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (ESCMID, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing -EUCAST)

Tradução:

Dra. Analy Salles de Azevedo Melo – Professora Afiada da Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São Paulo/SP – São Paulo/SP e Membro do Subcomitê de Antifúngicos no Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST)

Dr. João Nóbrega de Almeida Júnior - Médico Assistente do Laboratório de Microbiologia, Divisão de Laboratório Central, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) - São Paulo/SP e Membro do Subcomitê de Antifúngicos no Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST)

Dra. Kelly Ishida - Professora Doutora do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo (ICB-USP) – São Paulo/SP e Coordenadora do Subcomitê de Antifúngicos no Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST)

Data: 20 de agosto de 2018

INTRODUÇÃO

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos (TSA) são indicados para fungos que causam infecção especialmente quando a infecção é invasiva, quando o tratamento é falho ou recidivante, quando a resistência aos antifúngicos é possível, ou quando a sensibilidade não pode ser predita através da identificação da espécie. O TSA é também importante para a vigilância de resistência, estudos epidemiológicos e comparação da atividade *in vitro* dos antifúngicos novos e existentes.

Métodos de diluição são usados para estabelecer as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antimicrobianos: são métodos de referência para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, e são usados principalmente para estabelecer a atividade dos novos antifúngicos, para confirmar a suscetibilidade dos organismos que apresentam resultados conflitantes em outros testes de sensibilidade (como os testes comerciais), e para determinar a suscetibilidade de organismos quando outros testes não são confiáveis ou não foram validados. Em métodos de diluição, fungos são avaliados pela sua habilidade em produzir crescimento suficiente em poços de placas de microdiluição de meio de cultura líquido contendo diluições seriadas dos agentes antifúngicos (microdiluição em caldo).

A CIM do antifúngico é definida como a menor concentração, registrada em mg/L, do antifúngico que inibe o crescimento do fungo em percentual pré-definido (50%, 90%, ou inibição total). A CIM traduz a sensibilidade ou a resistência do organismo ao antifúngico, a qual pode ajudar em decisões de tratamento.

A versão atualizada (7.3.1) deste documento é direcionada para o teste de sensibilidade de leveduras de importância médica (primariamente *Candida* e *Cryptococcus*). A primeira versão deste documento foi publicada em um documento provisório (7.1) em 2003 [1] e definitivo em 2008 [2]. A segunda versão do documento continha informação adicional a respeito dos solventes para caspofungina, micafungina e fluconazol, tempo de estoque para placas contendo fluconazol, teste de sensibilidade para *Cryptococcus*, e os intervalos de CIM de anidulafungina para cepas de controle de qualidade [3]. A terceira versão foi harmonizada em texto e formato com o documento definitivo para fungos filamentosos, e os intervalos de CIM para as cepas de controle de qualidade foram removidos e separados em novo documento que resume tais valores (disponível no website <http://www.EUCAST.org>), evitando a necessidade de lançamento de novos documentos com eventuais atualização dos intervalos de CIM. A seção contendo a preparação e calibração do espectrofotômetro também foi modificada no presente documento.

ESCOPO

Esta padronização EUCAST descreve um método de teste de sensibilidade de leveduras para antifúngicos pela determinação da CIM. As CIMs mostram a atividade *in vitro* de determinado antifúngico nas condições descritas para o teste, e podem ser usados para o manejo das infecções em conjunto com outros fatores como farmacocinética, farmacodinâmica e mecanismos de resistência. Os valores de CIM permitem que os fungos sejam categorizados como “sensíveis”, “intermediários”, ou “resistentes” para determinados antifúngicos se

os pontos de cortes clínicos apropriados estiverem sido estabelecidos. Adicionalmente, a distribuição das CIMs pode ser usada para determinar populações selvagens ou não-selvagens quando pontos de corte epidemiológicos espécie-específicos são aplicados.

Este documento tem o intuito de fornecer um método adequado, fácil, rápido e econômico para o teste de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras, e facilitar o grau de reprodutibilidade inter-laboratorial. Fatores técnicos laboratoriais são de grande relevância, esta padronização é focada nas condições do teste, incluindo preparação e quantificação do inóculo, tempo de incubação, temperatura e formulação do meio.

TERMOS E DEFINIÇÕES

1. **Antifúngico:** substância de origem sintética ou semi-sintética que inibe o crescimento ou é letal para o fungo. Desinfetantes, antissépticos, ou conservantes não fazem parte desta definição.
2. **Propriedades dos antifúngicos:**
 - a. **Potência.** Fração antimicrobiana ativa de uma substância testada. A potência é expressa em miligramas por grama (mg/g), ou como conteúdo ativo em Unidades Internacionais (UI) por grama, ou como uma fração de volume ou fração de massa em percentual, ou como uma quantidade da concentração de uma substância (fração de massa) em mol por litro dos ingredientes na substância teste.
 - b. **Concentração.** Quantidade de um agente antimicrobiano em um volume definido do líquido. A concentração é expressa em unidades do Sistema Internacional (SI) como miligramas por litro (mg/L).
3. **Solução de estoque.** Solução inicial para as diluições adicionais.
4. **Concentração inibitória mínima.** Mínima concentração do antifúngico que inibe o crescimento da levedura em determinado período de tempo. A CIM é expressa em mg/L.
5. **Pontos de corte (*breakpoints*).** Valores específicos de CIM que permitem classificar a levedura como “sensível”, “intermediário”, ou “resistente”. Os valores dos pontos de corte podem ser alterados com o surgimento de novas informações (ex.: mudanças na dose de antifúngicos comumente usada).
 - a) **Sensível (S):** uma levedura é classificada como sensível a um nível de atividade antimicrobiana associada com uma alta probabilidade de sucesso terapêutico.
 - b) **Intermediário (I):** uma levedura é classificada como intermediário a um nível de atividade antimicrobiana associada com uma alta probabilidade de sucesso terapêutico somente quando são utilizadas doses mais altas do agente antimicrobiano que o normal, ou quando o agente tem elevada concentração no sítio da infecção .
 - c) **Resistente (R):** uma levedura é classificada como resistente a um nível de atividade antimicrobiana associada com uma alta probabilidade de falha terapêutica.
6. **Selvagem (*Wild Type, WT*):** uma levedura é denominada selvagem (*WT*) para uma espécie, pela ausência de resistência fenotípica adquirida detectável e mutações relacionadas a mecanismos de resistência para o agente em questão.

7. **Não Selvagem (Non-Wild Type, NWT):** uma levedura é denominada não selvagem (*NWT*) para uma espécie, pela presença de resistência fenotípica adquirida detectável ou mutações relacionadas a mecanismos de resistência para o agente em questão.

Notas

- a) Um isolado de levedura é classificado como S, I, ou R ao se aplicar os pontos de corte clínicos (*clinical breakpoints*) em um teste fenotípico definido.
- b) Um isolado de levedura é classificado como selvagem (*WT*) ou não selvagem (*NWT*) ao se aplicar os pontos de corte epidemiológicos (*ECOFFs*) em um teste fenotípico definido.
- c) Micro-organismos não selvagens (*NWT*) podem ter um ou mais mecanismos de resistência, mas dependendo dos valores dos pontos de cortes clínicos (*clinical breakpoints*), micro-organismos selvagens (*WT*) ou não selvagens (*NWT*) podem ou não responder ao tratamento com o agente específico.
- d) O micro-organismo selvagem é apresentado como $WT \leq z$ mg/L ou $NWT > z$ mg/L (onde z é o ponto de corte epidemiológico ou *ECOFF*). O *ECOFF* é o maior valor de CIM para isolados sem mecanismos de resistência fenotipicamente detectáveis.
- e) O valor de *ECOFF* não será alterado a não ser que novos dados acumulativos de CIM indiquem a necessidade de ajuste.

8. **Cepas de referência para controle de qualidade.** Cepas catalogadas e caracterizadas com estáveis e definidos fenótipos e/ou genótipos de suscetibilidade aos antifúngicos. São obtidas de coleções de culturas e usadas para fins de controle de qualidade.

9. Método do teste de sensibilidade

a) **Diluição em caldo.** Técnica em que diluições seriadas (usualmente 1:2) do antifúngico são realizadas em meio líquido que é inoculado com um número padronizado de organismos e incubado por um tempo determinado. O objetivo deste método é a determinação da CIM.

b) **Microdiuição.** Execução da diluição em caldo em placas de microdiluição com uma capacidade de aproximadamente 300 µL por poço.

10. **Caldo.** Meio líquido usado para o crescimento *in vitro* do fungo.

11. **Inóculo.** Número de leveduras (unidades formadoras de colônias) suspensa em um certo volume. O inóculo é expresso como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

PROCEDIMENTO DO TESTE

Geral

O teste é realizado em uma placa de microdiluição de fundo chato. Tampas de vedação de evaporação não devem ser utilizadas, pois afetam a concentração de oxigênio.

Dados preliminares sugerem que placas de microdiluição tratadas *versus* não tratadas para tecido produzem valores de CIMs diferentes (dados não publicados). Além disso, diferentes plásticos parecem ter impacto na ligação do antifúngico, o que pode afetar os valores de CIM. Estudos futuros são necessários para avaliar estes fatores. Para a maioria das distribuições de CIM obtidas pelo comitê do EUCAST para determinação de valores de ECOFF e pontos de corte foram utilizadas placas de microdiluição tratadas para tecidos, e portanto, melhores para produzir valores de CIM similares. O método é baseado na preparação de soluções de trabalho de agentes antifúngicos em volumes de 100 µL por poço, aos quais inóculos de 100 µL são adicionados.

Meio

RPMI 1640 (com L-glutamina, indicador de pH e sem bicarbonato) suplementado com glicose para uma concentração final de 2% (RPMI 2% G) é recomendado [4]. A utilização de 2%, ao invés do padrão de 0,2%, de concentração de glicose tem mostrado resultados com melhor crescimento e facilidade na determinação do ponto final [5]. Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) em concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0, é o tampão recomendado para ser usado para o meio RPMI 1640. A composição do RPMI 1640 está apresentada na Tabela 1. O meio recomendado, RPMI com 2% de glicose (RPMI 2% G), é preparado com o dobro da concentração (para permitir diluição de 50% [1:1] uma vez que o inóculo é adicionado; ver “Preparação de soluções de trabalho” adiante) como segue:

1. Adicione os componentes conforme a Tabela 2 a 900 mL de água destilada.
2. Agitar até que os componentes estejam completamente dissolvidos.
3. Com agitação, ajuste o pH para 7,0 a 25°C com 1 M de hidróxido de sódio.
4. Adicione água para um volume final de 1.000 mL.
5. Esterilizar por filtração utilizando filtro com poros de 0,22 µm.
6. Armazenar a temperatura de 4°C ou menor por até 6 meses.
7. Para controle de qualidade, use uma alíquota do meio esterilizado para verificar a esterilidade, para re-testar o pH (6,9 – 7,1 é aceitável) e para controle de crescimento com uma cepa referência.

Meio para teste de anfotericina B

Atualmente é recomendado que o RPMI 2% G seja usado também para anfotericina B. O caldo não-sintético Antibiotic Medium 3 (AM3), suplementado com concentração final de glicose a 2%, tem sido utilizado para a detecção de resistência a anfotericina B [6-9]. Entretanto, existe variações de lote para lote deste meio e também no desempenho do meio de diferentes fabricantes. Resultados preliminares também indicam que um inóculo de 0,5 – 2,5 x 10⁵ UFC/mL é muito alto para testar anfotericina B em AM3.

AGENTES ANTIFÚNGICOS

Geral

Todas as soluções de antifúngicos devem ser preparadas de acordo com as Boas Práticas de Fabricação. Pó puro dos antifúngicos devem ser adquiridos diretamente de fabricantes ou de fontes comerciais confiáveis. Preparações clínicas não devem ser utilizadas porque podem conter excipientes que podem interferir no teste de sensibilidade. Os pós devem ser fornecidos com o nome genérico do antifúngico, número de lote, potência, data de vencimento e condições recomendadas de armazenamento. Armazenar os pós em recipientes herméticos a -20°C ou temperatura mais baixa, com dessecante, exceto quando recomendado de outra forma pelo fabricante. Idealmente, agentes higroscópicos devem ser dispensados em alíquotas antes do congelamento, de forma que seja usado uma para cada ocasião. Os recipientes devem ser deixados a temperatura ambiente antes de serem abertos para evitar condensação de água sobre o pó.

Preparação de soluções estoque

Soluções dos antifúngicos devem ser preparadas levando-se em consideração a potência do lote do pó do antifúngico que será utilizado.

As quantidades do pó ou diluente necessárias para preparar a solução padrão devem ser calculadas como segue:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Volume (L)} \times \text{Concentração (mg/L)}}{\text{Potência (mg/g)}}$$

$$\text{Volume (L)} = \frac{\text{Peso (g)} \times \text{Potência (mg/g)}}{\text{Concentração (mg/L)}}$$

O pó do antifúngico deve ser pesado em balança analítica que tenha sido calibrada com referências de peso por uma organização certificada em metrologia. A porção do pó do antifúngico pesado deve exceder a precisão da balança em pelo menos 10-100 vezes. Prepare a solução estoque do antifúngico em concentrações pelo menos 200 vezes maiores que a maior concentração a ser testada na placa de microdiluição. Informações sobre a solubilidade dos antifúngicos devem ser fornecidas pelos fornecedores. Solventes que não sejam a água são necessários para dissolver a maioria dos antifúngicos (Tabela 3). É essencial certificar-se que o antifúngico esteja completamente dissolvido antes do congelamento. Diversos antifúngicos podem ser difíceis de dissolver resultando em CIMs artificialmente elevados. Colocar o tubo da solução estoque em um agitador por uma hora ou mais antes de continuar o procedimento pode resolver este problema. Esterilização das soluções estoque é normalmente desnecessária. Entretanto, se esterilização for necessária, o procedimento deve ser validado por meios apropriados (por exemplo, amostras antes e após filtração devem ser testadas)

para certificar que o antifúngico não tenha sido adsorvida (por exemplo em um filtro estéril) ou degradada durante o processo.

A menos que outra maneira seja indicada pelo fabricante do antifúngico, armazene as soluções em pequenos volumes em frascos de polipropileno ou polietileno a -70°C ou abaixo. Os antifúngicos podem ser armazenados a -70°C por pelo menos 6 meses sem perda significativa de atividade [10, 11]. As equinocandinas foram previamente consideradas como instáveis a -70°C , entretanto, elas se mantiveram estáveis por pelo menos 6 meses a esta temperatura [11].

Remova os frascos do freezer -70°C e use no mesmo dia que forem descongelados. Deterioração significativa do antifúngico irá refletir nos resultados dos testes de sensibilidade das cepas de controle de qualidade (disponível no website do EUCAST <http://www.EUCAS.T.org>). Se necessário, o antifúngico pode ser testado para determinar a potência.

Preparação das soluções de trabalho

A variação das concentrações testadas irá depender do organismo e do antifúngico a serem testados. A variação das concentrações deve incluir o ponto de corte, se este existir, bem como os resultados esperados para as cepas de controle de qualidade. As variações das concentrações dos antifúngicos recomendadas estão na Tabela 3. Séries de diluições de 2 vezes baseadas em 1 mg/L são preparadas em RPMI 2% G, 2x concentrado. O meio RPMI 2% G usado nas placas é preparado com o dobro da concentração final para permitir uma diluição de 50%, uma vez que o inóculo será adicionado. Esta abordagem permite que o inóculo seja preparado em água destilada.

As diluições devem ser preparadas de acordo com o ISO de recomendações [12]. Por exemplo, uma alternativa que utiliza volumes menores para a preparação de séries com concentrações finais de 0,125-64 mg/L é mostrado na Tabela 4 (veja a Tabela 3 para verificar os solventes necessários para cada antifúngico). Um resumo dos passos necessários para preparação das soluções de trabalho (2 x concentração final) está descrito a seguir:

1. Tire um tubo da solução estoque do antifúngico do freezer -70°C . Vários antifúngicos podem ser difíceis de dissolver resultando em CIMs elevadas e artificiais.
2. Dispense volumes apropriados do solvente (consulte a Tabela 3 para os tipos de solventes e Tabela 4 para o volume dos solventes) em outros 9 tubos.
3. Siga os passos descritos na tabela 4 para processar as séries de diluições a 200 vezes a concentração final. Esquemas de diluições com concentrações de 3200 mg/L ou 1600 mg/L no passo 1 da Tabela 4 são necessários para as séries de diluições de 0,03-16 mg/L e 0,015-8 mg/L, respectivamente.
4. Dispense 9,9 mL do meio RPMI 2% G com o dobro da concentração em 10 tubos.
5. Retire 100 μL de cada tubo com 200 x a concentração final do antifúngico em solvente e transfira para 10 tubos com 9,9 mL do meio de cultura (diluição 1:100). A concentração do solvente nos tubos com o meio de cultura é 1% e a concentração dos agentes antifúngicos é 2 x a concentração final.

Esquemas de diluição alternativos podem ser usados se eles mostrarem um desempenho tão bom quanto ao método de referência [13].

Preparação das placas de microdiluição

Usar plásticos estéreis (evitando os plásticos de alta ligação), descartáveis, placas de microdiluição com 96 poços, com poços de fundo chato, sem tampas de baixa evaporação, com capacidade de aproximadamente 300 µL por poço.

Nos poços de 1 a 10 de cada coluna da placa de microdiluição, dispense 100 µL de cada tubo contendo a concentração correspondente (2 x a concentração final) do agente antifúngico. Por exemplo, para itraconazol, dispense na coluna 1 o meio contendo 16 mg/L, na coluna 2 meio contendo 8 mg/L e assim por diante até a coluna 10 para o meio contendo 0,03 mg/L.

Para cada poço das colunas 11 e 12, dispense 100 µL do meio RPMI 2% G com o dobro da concentração.

Sendo assim, cada coluna de 1 a 10 conterá 100 µL de 2x a concentração final do antifúngico em meio RPMI 2% G com o dobro da concentração e com 1% do solvente. As colunas 11 e 12 conterão o dobro da concentração do meio RPMI 2% G.

Estoque das placas de microdiluição

As placas podem ser seladas com filme plástico ou folha de alumínio e estocadas a -70°C ou abaixo por até 6 meses ou a -20°C por no máximo 1 mês sem perda da potência do antifúngico [11]. As equinocandinas são menos estáveis, portanto devem ser preparadas e estocadas a -70°C (e não a -20°C) (dados não publicados, M Cuenca-Estrella).

Uma vez que as placas forem descongeladas, não devem ser recongeladas. As placas devem ser usadas imediatamente quando forem retiradas do freezer, particularmente CIMs de anidulafungina podem aumentar se as placas forem deixadas a temperatura ambiente depois de descongeladas muito antes da inoculação.

PREPARAÇÃO DO INÓCULO

A padronização do inóculo é essencial para a acurácia e reprodutibilidade dos testes de sensibilidade aos antifúngicos.

O inóculo deve ser preparado ressuspensando 5 colônias representativas, obtidas de cultura de 18-24 h em meio ágar nutritivo, em água destilada. A concentração final deve ficar entre $0,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^5$ CFU/mL.

Método de suspensão da colônia

1. Cultive todas as leveduras em ar ambiente entre 34 e 37°C em meio ágar nutritivo não seletivo (ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata dextrose) por 18-48 h antes do teste.
2. Prepare o inóculo ressuspensando 5 colônias distintas, ≥ 1 mm de diâmetro de uma cultura de 24 h, em pelo menos 3mL de água destilada.

3. A suspensão é homogeneizada por 15 segundos em agitador giratório a aproximadamente 2.000 rpm. Ajuste a densidade celular para a densidade da escala 0,5 McFarland (Tabela 5) medindo a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm e adicione água destilada necessária. Isto dará um suspensão de leveduras de $1-5 \times 10^6$ CFU/mL. Prepare uma suspensão de trabalho para uma diluição de 1 para 10 da suspensão padrão de $1-5 \times 10^6$ CFU/mL. A densidade celular também pode ser ajustada em um turbidímetro com autocalibração ajustada assegurando um inóculo com a densidade da escala 0,5 McFarland.

Cryptococcus spp.

Cryptococcus spp. são leveduras não fermentadoras. A falta de fermentação compromete o crescimento nas placas de microdiluição quando realizado de acordo com os protocolos sugeridos pelo CLSI e EUCAST.

Um estudo recente explorou as variações dos protocolos dos testes de sensibilidade do EUCAST em comparação com o protocolo padrão para *Candida* [14]. As modificações incluíram 1) meio de crescimento (meio RPMI *versus* base nitrogenada de levedura (YNB)), 2) concentração de glicose (0,2% *versus* 2%), 3) fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), 4) temperatura (30 °C *versus* 35 °C), 5) agitação, 6) tamanho do inóculo (10^3 , 10^4 , e 10^5 células). Taxa de crescimento e CIM foram analisados e comparados. Embora o uso do meio YNB, redução da temperatura de incubação para 30 °C e agitação das placas durante a incubação aumentaram a taxa de crescimento, não houve nenhuma diferença significativa entre os valores de CIM obtidos com os diferentes métodos. A diferença entre os valores de CIM não foi mais que duas diluições 1:2. Por isso, é recomendado, por enquanto, que a metodologia EUCAST seja adotada para o teste de sensibilidade para espécies de *Cryptococcus*. Consequentemente, é recomendado o uso do meio RPMI 2%G como meio de crescimento, inóculo final de $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL, incubação sem agitação e leituras das placas quando o valor de D.O. exceda 0,2. Nos casos em que o crescimento é insuficiente é sugerido que o teste seja repetido mas com temperatura de incubação de 30 °C.

INOCULAÇÃO DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO

As placas de microdiluição devem ser inoculadas dentro de 30 min da preparação da suspensão do inóculo a fim de manter a concentração de células viáveis.

Agitar a suspensão do inóculo e inocular em cada poço da placa de microdiluição com 100 µL da suspensão de leveduras $1-5 \times 10^5$ UFC/mL padronizadas em água destilada estéril, sem tocar no conteúdo do poço. Este procedimento dará a concentração do antifúngico e a densidade do inóculo requeridas (inóculo final = $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Também, inocular nos poços do controle de crescimento (coluna 11), contendo 100 µL de meio estéril livre de antifúngico, com 100 µL da mesma suspensão do inóculo. Preencher a coluna 12 da placa de microdiluição com 100 µL da água estéril do lote usado para o preparo do inóculo como controle de esterilidade para o meio e água destilada (somente meio livre de antifúngico). Teste os organismos de controle de qualidade pelo mesmo método cada vez que um isolado for testado.

Contagem de viabilidade deve ser realizada para controle de qualidade para confirmar que os poços testes contém entre $1 - 5 \times 10^5$ UFC/mL do seguinte modo: Uma suspensão é homogeneizada com um agitador giratório a 2.000 rpm. Em seguida, 10 μ L da suspensão deve ser cultivada na superfície do ágar (como ágar Sabouraud dextrose ou ágar cromogênico), e a placa incubada por 24-48 h ou até que as colônias possam ser verificadas quanto à pureza. Uma outra diluição de 50 μ L da suspensão em 4,95 mL de água destilada estéril, homogeneizado, e 10 μ L da suspensão deve ser cultivada na superfície do ágar para proporcionar uma contagem opcional/adicional – dez a cinquenta colônias seria esperado. É recomendado que seja realizado o procedimento completo para todos os isolados quando o laboratório estiver padronizando o teste, quando o teste é raramente/periodicamente realizado ou quando os resultados forem incoerentes (a ser definido localmente dependendo da necessidade).

INCUBAÇÃO DAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO

Incubar as placas de microdiluição sem agitação a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h em ar atmosférico. Uma absorbância $\leq 0,2$ indica um pobre crescimento e é comumente visto entre os isolados de *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*. Tais placas devem ser reincubadas por mais 12-24 h e depois, realizar a leitura novamente. Se absorbância permanecer $\leq 0,2$ após 48 h este resultado indica falha no teste. Como descrito acima, uma absorbância $\leq 0,2$ após 48 h para *Cryptococcus* spp., o teste deverá ser repetido com incubação a 30 °C.

RESULTADOS DA LEITURA

As placas de microdiluição deverão ser lidas em um leitor de placas de microdiluição. O comprimento de onda recomendado para determinar a absorbância da placa é de 530 nm, embora outros possam ser utilizados, por exemplo, 405 nm ou 450 nm. A valor do branco da amostra deverá ser subtraído das leituras dos outros poços.

Anfotericina B

A CIM da anfotericina B é a menor concentração que leva a inibição ≥ 90 % de crescimento quando comparado com controle de crescimento livre de antifúngico.

Flucitosina, agentes azólicos e equinocandinas

A CIM de flucitosina (5-flucitosina), agentes azólicos e equinocandinas é a menor concentração que leva à inibição ≥ 50 % de crescimento quando comparado com controle de crescimento livre de antifúngico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

EUCAST tem estabelecido os valores de pontos de corte dos compostos ativos para a maioria das leveduras e espécies de *Candida* (que, juntamente com a literatura relevante, são encontrados em publicações [15-17] e no site da EUCAST <http://www.EUCAST.org>). Interpretação de CIMs para outras combinações de antifúngicos: organismos na ausência de pontos de corte está mudando e deve ser feito muito cuidadosamente levando em consideração dados disponíveis incluindo experiência clínica, exposição ao antifúngico durante a terapia, etc. Entretanto, a CIM ainda pode fornecer algumas informações sobre suscetibilidade, e

importantemente gerar dados de CIMs para outras leveduras é um pré-requisito vital para futuras escolhas de valores de pontos de corte e de ECOFFs.

CONTROLE DE QUALIDADE

Procedimentos de controle são os meios pelos quais a qualidade dos resultados é assegurada e são descritos em detalhes pelo CLSI [18]. A qualidade dos resultados dos testes é monitorado pelo uso de cepas controles.

Cepas controle

CIMs para as cepas controles devem idealmente estar próximos aos situados no meio do intervalo das concentrações de uma série 1:2 e o padrão de suscetibilidade aos antifúngicos deve ser estável. As cepas controles recomendadas (disponível no website EUCAST <http://www.EUCAST.org>) foram selecionadas de acordo com esses critérios. Um estudo recente tem indicado que as duas cepas controles comumente usadas, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, não são suficientemente sensíveis na detecção da variação da potência da caspofungina, e que *C. albicans* ATCC 64548 ou *C. albicans* ATCC 64550 são superiores para este propósito [11]. Cepas controles devem ser obtidas de fontes confiáveis como *American Type Culture Collection* (ATCC), *National Collection for Pathogenic Fungi* (NCPF), *Central Bureau voor Schimmelcultures* (CBS) ou fornecedores comerciais que oferecem garantia de qualidade similar.

Estoque das cepas controles

Leveduras isoladas podem ser estocadas como liofilizados ou congelados a -60 °C ou inferior. Culturas podem ser estocados em curto tempo (menos de 2 semanas) sobre ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata dextrose inclinados a 2-8 °C, com novas culturas sendo preparadas de estoques congelados a cada duas semanas.

Uso de rotina das cepas controles

Para o uso de rotina de cepas controles, culturas frescas devem ser preparadas de cultura em ágar inclinado, ou congelada ou liofilizada pela inoculação sobre um ágar de meio nutritivo e não seletivo (por exemplos ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata dextrose).

1. Pelo menos uma cepa controle deve ser incluída por teste e as CIMs devem estar dentro do intervalo esperado (disponível no website EUCAST <http://www.EUCAST.org>). Se mais de um em 20 testes estiver fora do intervalo esperado a fonte do erro deverá ser investigada.
2. Cada teste deve incluir um poço de meio sem antifúngico para demonstrar crescimento do organismo teste e produzir a turbidez controle para as leituras do ponto final.
3. Subcultura do inóculo sobre um meio adequado (preferencialmente um meio cromogênico) para garantir a pureza e para produzir colônias frescas se o teste for repetido.
4. Testar cada novo lote de meio RPMI 1640-2% G e placas de microdiluição com pelo menos duas cepas controle (disponível no website EUCAST <http://www.EUCAST.org>) para garantir que as CIMs estejam dentro dos intervalos esperados.

REFERÊNCIAS

- 1 Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, et al. Method for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: i-viii.
- 2 EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 398-405.
- 3 Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: E246-247.
- 4 Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34: 1648-1654.
- 5 Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40: 401-414.
- 6 Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2070-2074.
- 7 Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of Antibiotic Medium 3 used for testing susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 270-272.
- 8 Rex JH, Cooper CR, Jr., Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 906-909.
- 9 Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: Enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 2520-2522.
- 10 Anhalt J, Washington I. Preparation and storage of antimicrobials, p. 1199-1200. In Ballows, A (ed), *Manual of Clinical Microbiology.* 1991.
- 11 Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. Using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard procedures: Analysis of the influence of bovine serum albumin supplementation, storage time, and drug lots. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 1580-1587.
- 12 ISO. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - part 1: Reference methods for testing the in vitro activity of antimicrobials. Geneva, Switzerland. 2006.
- 13 Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Multicenter comparison of the ISO standard 20776-1 and the serial 2-fold dilution procedures to dilute hydrophilic and hydrophobic antifungal agents for susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1918-1920.

- 14 Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gomez-Lopez A, Bernal-Martinez L, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 1563-1570.
- 15 Cavling Arendrup M, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. EUCAST technical note on *Candida* and micafungin, anidulafungin and fluconazole. *Mycoses*. 2014; 57: 377-379.
- 16 Lass-Flörl C, Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Donnelly P, Hope W. EUCAST technical note on amphotericin B. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: E27-E29.
- 17 Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Hope W, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL. EUCAST technical note on posaconazole. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: E16-17.
- 18 Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa*. 2008.
- 19 Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: Analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 819-826.
- 20 Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, et al. Quality control guidelines for national committee for clinical laboratory standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1104-1107.
- 21 Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmstrom A, Rinaldi MG. Quality control guidelines for national committee for clinical laboratory standards--recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 816-817.

Tabela 1. Composição do meio RPMI 1640.

Constituinte	g/L
L-arginina (base livre)	0,200
Biotina	0,0002
L-asparagina (anidra)	0,050
D-pantotênico	0,00025
L-aspártico, ácido	0,020
Colina, cloreto de	0,003
L-cistina • 2HCl	0,0652
Fólico, ácido	0,001
L-glutâmico, ácido	0,020
Mioinositol	0,035
L-glutamina	0,300
Niacinamida	0,001
Glicina	0,010
PABA	0,001
L-histidina (base livre)	0,015
Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxi prolina	0,020
Riboflavina	0,0002
L- isoleucina	0,050
Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050
Vitamina B12	0,000005
L-lisina • HCl	0,040
Nitrato de cálcio.H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015
Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015
Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020
Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030
Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	0,800
L-treonina	0,020
D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005
Glutamina, reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883
Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020

Tabela 2. Componentes do meio RPMI 2% G.

Componentes	Concentrado 2x
Água destilada	900 mL ^a
RPMI 1640 (Tabela 1)	20,8 g
MOPS	69,06 g
Glicose	36 g

^aDissolver o pó em 900 mL de água destilada. Após a dissolução e sob agitação, ajustar o pH para 7,0 a 25 °C usando 1 M de hidróxido de sódio. Adicionar o restante de água destilada até o volume final de 1.000 mL. Esterilizar por filtração antes do uso.

Tabela 3. Solventes para preparação de soluções estoques, características e intervalos de concentração teste apropriados para os agentes antifúngicos.

Agente antifúngico	Solvente	Características	Intervalo teste (mg/mL)
Anfotericina B	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Anidulafungina	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Caspofungina	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Fluconazol	DMSO/água ^a	Hidrofóbico/hidrofílico	0,125 - 64
Flucitosina	água	hidrofílico	0,125 - 64
Isavuconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Itraconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Micafungina	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Posaconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4
Voriconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,008 - 4

DMSO , dimetil sulfóxido

^aDe acordo com as instruções do fabricante. A substância pura original da Pfizer foi prontamente solúvel em água. O pó da Sigma-Aldrich é altamente hidrofóbico e pouco solúvel em água devendo, portanto, ser diluído em DMSO, como recomendado pelo fornecedor (http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F8929|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).

Tabela 4. Esquema para preparar as séries de diluição dos antifúngicos com concentrações finais de 0,125 – 64 mg/L.

Etapa	Concentração (mg/L)	Fonte	Volume do antifúngico (µL)	Volume do solvente ^a (µL)	Concentração intermediária (mg/L)	Concentração (mg/L) após diluição 1:1000 com meio RPMI 2% G (2x concentrado) ^b
1	12.800 ^c	Estoque	200	0	12.800	128
2	12.800	Estoque	100	100	6.400	64
3	12.800	Estoque	50	150	3.200	32
4	12.800	Estoque	50	350	1.600	16
5	1.600	Etapa 4	100	100	800	8
6	1.600	Etapa 4	50	150	400	4
7	1.600	Etapa 4	50	350	200	2
8	200	Etapa 7	100	100	100	1
9	200	Etapa 7	50	150	50	0,5
10	200	Etapa 7	25	175	25	0,25

^a Consultar a Tabela 3 para solventes requeridos para diluir os antifúngicos

^b Diluição 1:1 com suspensão do inóculo resulta em concentrações final à metade daquelas indicadas na tabela.

^c Para diluição em série com a mais alta concentração de 16 mg/L ou 8 mg/L, iniciar com as concentrações estoques de 3.200 mg/L e 1.600 mg/L, respectivamente.

Tabela 5. Preparação da escala padrão de turbidez 0.5 Mc Farland.

Etapa	Procedimento
1	Adicionar 0,5 mL de 0,048 mol/L BaCl ₂ (1.175% w/v BaCl ₂ x 2 H ₂ O) a 99,5 mL de 0,18 mol/L (0,38 N) H ₂ SO ₄ (1% v/v) e misturar completamente
2	Checar a densidade com um espectrofotômetro em cubeta de 1 cm. A absorbância a 625 nm deverá ser de 0,08 a 0,13
3	Distribuir em tubos de tampa de rosca do mesmo tamanho do tubo que será usado para ajustar o inóculo
4	Estocar os padrões fechados protegidos da luz e a temperatura ambiente
5	Agitar os padrões completamente no agitador imediatamente antes do uso
6	Renovar os padrões ou checar a sua absorbância após 3 meses