



EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 9.3.2 – Abril 2020

Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para fungos filamentosos formadores de conídios

Autores: M. C. Arendrup, J. Meletiadis, J. W. Mouton, K. Lagrou, Petr Hamal, J Guinea and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

Tradução:

Dra. Analy Salles de Azevedo Melo – Professora Visitante, 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)

Dra. Kelly Ishida - Professora Associada 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)

INTRODUÇÃO

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos (TSA) são indicados para fungos que causam infecção especialmente quando a infecção é invasiva, recidivante, quando o tratamento é falho, 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. Eles são os 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 (que ainda é um cenário comum para testes de sensibilidade para fungos filamentosos). 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 agente que inibe o crescimento do fungo. A CIM informa sobre a sensibilidade ou a resistência do organismo ao antifúngico, a qual pode ajudar em decisões de tratamento.

O aumento do número de opções para o tratamento de micoses invasivas causadas por fungos filamentosos associado a resistência documentada aos antifúngicos entre algumas cepas e espécies, tem confirmado a necessidade para se ter métodos padronizados na determinação *in vitro* da sensibilidade de antifúngicos novos e existentes contra isolados clínicos de fungos filamentosos [1-10].

A primeira versão de um método padrão foi publicada como um documento definitivo em Julho de 2008 [11]. A segunda versão foi atualizada para refletir o conhecimento atual sobre as indicações para TSA em fungos filamentosos, estabilidade das equinocandinas, preparação de inóculo especificamente para *Aspergillus* (incluindo padronização espectrofotométrica da concentração de inóculo), dicas práticas sobre leitura do ponto final (ilustrações da leitura do ponto final) e interpretação do ponto final (reconhecendo os valores de pontos de cortes clínicos estabelecidos) [12]. Esta terceira versão foi harmonizada com o documento E.Def 7.3.2 para leveduras, alguns detalhes técnicos foram incluídos, as referências foram atualizadas para refletir o conhecimento contemporâneo, a definição revisada da categoria I foi introduzida e os intervalos de CIM para cepas de controle de qualidade foram removidos. Este último foi feito reconhecendo o novo documento separado que resume todos os intervalos de CIM dos antifúngicos para cepas de controle de qualidade (disponíveis no site EUCAST: <http://www.EUCAST.org>) e para evitar a necessidade de atualização de documentos de métodos sempre que um novo controle de qualidade é estabelecido. Além disso, a seção

referente à preparação e calibração do espectrofotômetro foi modificado no documento atual.

SCOPO

Esta padronização EUCAST descreve um método adequado para testar a sensibilidade de fungos filamentosos produtores de conídios aos agentes antifúngicos por determinação da CIM. As CIMs mostram a atividade *in vitro* de um determinado antifúngico nas condições de teste descritas e podem ser usadas para o gerenciamento de pacientes em conjunto com outros fatores, como farmacocinética, farmacodinâmica e mecanismos de resistência. A CIM permite que os fungos filamentosos sejam classificados como "sensíveis" (S), "sensíveis, maior exposição" (I) ou "resistentes" (R) a um antifúngico quando pontos de cortes apropriados são aplicados [13, 14]. Além disso, as distribuições de CIMs podem ser usadas para definir populações de fungos do tipo selvagem ou não selvagem quando são aplicados valores de corte epidemiológicos específicos da espécie (ECOFFs).

O método aqui descrito destina-se a fornecer um método adequado, fácil, rápido e econômico para testar a sensibilidade aos agentes antifúngicos de fungos filamentosos e facilitar um grau aceitável de conformidade, isto é, em concordância com os intervalos especificados, entre os laboratórios. Muitos fatores influenciam a CIM de agentes antifúngicos contra fungos filamentosos, como mostra Rambali et al. [15]. Por exemplo, a CIM do itraconazol contra *Aspergillus* foi profundamente influenciada pela forma do poço de microdiluição, concentração do inóculo, temperatura e duração do tempo de incubação. Assim, como os fatores técnicos de laboratório são de extrema importância, esta padronização se concentra nas condições de teste, incluindo a preparação e tamanho do inóculo, tempo e temperatura de incubação e formulação do meio.

TERMOS E DEFINIÇÕES

1. **Antifúngico:** substância de origem biológica, sintética ou semi-sintética que inibe o crescimento ou é letal para o fungo filamentoso. 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 SI como miligramas por litro (mg/L).
3. **Solução de estoque.** Solução inicial usada para as diluições adicionais.

4. **Concentração inibitória mínima (CIM).** Mínima concentração do antifúngico que inibe o crescimento do fungo filamentososo em determinado período de tempo. A CIM é expressa em mg/L.
5. **Pontos de corte (*breakpoints*).** Valores específicos de CIM que permitem classificar o fungo como “sensível”, “sensível, maior exposição*” e “resistente”. Os valores dos pontos de corte podem ser alterados com o surgimento de novas informações (ex.: mudanças na dose de antifúngicos comumente usados) ou quando dados adicionais surgem.
- a) **S – Sensível, regime de dosagem padrão:** Um micro-organismo é classificado como “Sensível, regime de dosagem padrão”, quando há alta probabilidade de sucesso terapêutico usando o regime de dosagem padrão do agente antifúngico
- b) **I - Sensível, maior exposição*:** Um micro-organismo é classificado como um fungo filamentososo “Sensível, maior exposição*” quando há alta probabilidade de sucesso terapêutico em decorrência do aumento de exposição ao agente ajustando o regime de dosagem ou a sua concentração no local da infecção.
- c) **R - Resistente:** Um micro-organismo é classificado como “Resistente” quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento de exposição.
- * A exposição é uma função de como o modo de administração, dose, intervalo de dosagem, tempo de infusão, bem como a distribuição e excreção do agente antimicrobiano influenciarão o organismo infectante no local da infecção.
6. **Selvagem (*Wild Type, WT*).** Um fungo filamentososo é denominado 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*).** Um fungo filamentososo é denominado 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 fungo filamentososo 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 fungo filamentososo 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 clinicamente 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 acumulados 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) Microdiluição. 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 conídios (unidades formadoras de colônias) suspendida 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. 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 da droga, 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 e indicador de pH sem bicarbonato) suplementado com glicose para uma concentração final de 2% (RPMI 2% G) é recomendado [16,17]. 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 [18]. 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.

AGENTES ANTIFÚNGICOS

Geral

Todas as soluções de antifúngicos devem ser preparadas de acordo com as Boas Práticas de Fabricação. Pó puro de 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 da droga, 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.

A quantidade do pó ou diluente necessários para preparar a solução padrão deve ser calculada 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. Outros solventes que não 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 elevadas. 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 adsorvido (por exemplo em um filtro estéril) ou degradado 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 [19]. As equinocandinas foram anteriormente consideradas como instáveis a -70°C , entretanto, elas se mantiveram estáveis por pelo menos 6 meses a esta temperatura [20].

Remova os frascos do freezer -70°C e use no mesmo dia que forem descongelados. Descartar o volume não utilizado neste dia. Deterioração significativa do antifúngico irá refletir nos resultados dos testes de sensibilidade das cepas de controle de qualidade (Tabela 7). 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 (Tabela 4). 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 (Tabela 4) [21]. 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 artificialmente elevadas.

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 produzir as séries de diluições a 200 vezes a concentração final. Esquemas de diluições com concentrações estoque de 3.200 mg/L ou 1.600 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 uma performance tão boa quanto ao método de referência [22].

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 [23-25]. 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.

A concentração final deve ficar entre 1×10^5 e $2,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Método de suspensão do conídio

Os isolados são subcultivados sobre ágar batata dextrose ou em ágar Sabouraud dextrose ou em outro meio em que o fungo seja hábil para esporular suficientemente e incubados a 35°C. Suspensões dos inóculos são preparados de culturas frescas e maduras (2-5 dias). Em alguns casos uma incubação estendida é necessária para esporulação apropriada do isolado.

Cobrir a colônia com aproximadamente 5 mL de água destilada estéril suplementado com 0,1% de Tween 20. Posteriormente, os conídios são cuidadosamente raspados com um *swab* estéril e transferido com uma pipeta para um tubo estéril. Alternativamente, um *swab* estéril úmido pode ser usado e tocado gentilmente na cultura para coleta de conídios e transferidos para um tubo estéril contendo água destilada estéril suplementado com 0,1% de Tween 20. A suspensão é homogeneizada por 15 segundos em agitador giratório a aproximadamente 2.000 rpm. Em geral diluições apropriadas são feitas para atingir a concentração certa para a contagem em uma câmara hemocitométrica (ver comentário abaixo para procedimento alternativo para *Aspergillus* sp.). Preparações de inóculos deve também ser examinadas para a presença de hifas e aglomerados. Se um número significativo de hifas é detectado (> 5% das estruturas fúngicas), transferir 5 mL da suspensão em uma seringa estéril e anexar a um filtro estéril com poros de diâmetro de 11 μ m, filtrar e coletar em um tubo estéril. Esta etapa remove as hifas para obter uma suspensão composta por conídios. Se aglomerados são detectados, o inóculo é agitado novamente em um agitador por 15 segundos. Repetir esta etapa muitas vezes se necessário até que os aglomerados não sejam mais encontrados. Ajustar a suspensão com água destilada estéril para $2-5 \times 10^6$ conídios/mL pela contagem de conídios em uma câmara hemocitométrica. Alternativamente, a suspensão de conídios de *Aspergillus* pode ser ajustada usando espectrofotômetro a uma concentração equivalente a escala 0,5 McFarland (Tabela 5) [26, 27].

A suspensão é então diluída 1:10 em água estéril para obter a concentração de trabalho do inóculo de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL [26-29].

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 conídios viáveis.

Agitar a suspensão do inóculo e inocular em cada poço da placa de microdiluição com 100 μ L da suspensão de conídios a $2-5 \times 10^5$ UFC/mL, sem tocar no conteúdo do poço. Este procedimento dará a concentração do

antifúngico e a densidade do inóculo requeridos (inóculo final = $1-2,5 \times 10^5$ UFC/mL).

Também, inocular nos poços do controle de crescimento (coluna 11), contendo 100 µL de meio estéril livre de antifúngico, 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 $1 - 2,5 \times 10^5$ UFC/mL do seguinte modo: 10 µL da suspensão do inóculo deve ser diluída em 2 mL de água destilada estéril suplementado com 0,1% Tween 20. A suspensão é agitada em um agitador giratório a 2.000 rpm. Posteriormente, 100 µL desta suspensão é espalhada na superfície de uma placa contendo meio adequado (como ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata dextrose), que é incubada por 24-48 h ou até que colônias possam ser contadas. Contagem de 100 a 250 colônias são esperadas de uma suspensão teste aceitável. Uma outra diluição de 100 µL da suspensão do inóculo em 900 µL de água destilada estéril suplementado com 0,1% Tween 20, homogeneizado, e 100 µL da suspensão é plaqueada 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 34 a 37 °C por em ar atmosférico. Mucolares devem ser incubados por 24 h quando o crescimento for suficiente, enquanto outros fungos filamentosos devem ser incubados por 48 h. Em poucos casos, 24 h a mais de incubação será necessária para se que tenha crescimento fúngico suficiente no poço controle (por exemplo *Scedosporium*). Incubação superior a 72 h não é recomendada.

RESULTADOS DA LEITURA

O ponto final é lido visualmente, registrando o grau de crescimento fúngico de cada poço.

- Ponto final da CIM para todos os antifúngicos, exceto para equinocandinas: a concentração do antifúngico que não produz crescimento visível a olho é o valor da CIM. Ignore as colônias únicas na superfície e os "poços pulados" (um único poço sem crescimento entre os poços positivos para o crescimento). Recomenda-se usar um papel preto e branco horizontal como plano de fundo para a placa quando o resultado for registrado, pois a linha entre a cor branca e preta só aparecerá nítida e distinta quando vista através da placa elevada quando o poço estiver sem crescimento (Fig. 1).
- O ponto final de Concentração Efetiva Mínima (CEM) para equinocandinas é a menor concentração de

equinocandinas, na qual *clusters* de hifas anormais, curtas e ramificadas são observados em contraste com as hifas longas, não ramificadas, que são normalmente observadas no poço de controle de crescimento (Fig. 2). Em algumas ocasiões, isso pode ser registrado visualmente como a menor concentração do antifúngico que resulta em crescimento filamentosos macroscópico alterado semelhante ao observado em poços de controle positivo para microcolônias ou crescimento granular (que são ignorados), embora isso raramente seja observado. Quando esse não for o caso, é necessário examinar um pequeno volume dos poços sob o microscópio para observar alterações morfológicas induzidas pelo antifúngico, ou um microscópio invertido pode ser usado para visualizar alterações do fungo dentro dos poços.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O EUCAST estabeleceu pontos de corte para anfotericina B, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol e espécies de *Aspergillus* que, juntamente com a literatura relevante, são encontrados em publicações e no site do EUCAST [13, 14]. Ainda não há dados disponíveis para sugerir uma correlação entre a CEM das equinocandinas e o resultado do tratamento. A interpretação de CIMs para outros fungos filamentosos na ausência de pontos de corte é desafiadora e deve ser feita com muito cuidado, levando em consideração todos os dados disponíveis, incluindo experiência clínica, exposição aos antifúngicos durante a terapia, etc. No entanto, a CIM ainda pode fornecer algumas informações sobre sensibilidade, e a obtenção de CIMs para outros fungos filamentosos é um pré-requisito vital para a seleção futura de valores de ECOFFs e pontos de corte.

CONTROLE DE QUALIDADE

Os procedimentos de controle são os meios pelos quais a qualidade dos resultados é garantida e são descritos em detalhes pelo CLSI [30]. A qualidade rotineira dos resultados dos testes é monitorada pelo uso de cepas controle.

Cepas controle

Idealmente, as CIMs para cepas controle devem estar próximas do meio do intervalo das duas séries testadas e os padrões de sensibilidade aos antifúngicos devem ser estáveis. As cepas de controle recomendadas (disponíveis no site do EUCAST: <http://www.EUCast.org>) foram selecionadas de acordo com esses critérios [30].

Estoque das cepas controle

Os isolados fúngicos podem ser armazenados liofilizados ou congelados a -60°C ou abaixo [31]. As culturas podem ser armazenadas a curto prazo (menos de 2 semanas) no ágar Sabouraud dextrose ou no ágar batata dextrose a $2-8^{\circ}\text{C}$, com novas culturas preparadas a partir de estoques congelados a cada duas semanas.

Uso de rotina das cepas controle

Para uso rotineiro de cepas controle, culturas frescas devem ser preparadas a partir da cultura em ágar,

culturas congeladas ou liofilizadas por inoculação em meio de ágar nutritivo não seletivo (por exemplo, ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata dextrose).

1. Pelo menos uma linhagem de controle deve ser incluída por execução de teste e as CIMs devem estar dentro dos intervalos dos controles (disponível no site do EUCAST: <http://www.EUCAST.org>). São necessárias duas ou mais cepas se a CIM da cepa controle de qualidade estiver fora da faixa de concentração testada para um ou mais compostos. Se os resultados das CIMs dos controles estiverem fora da faixa esperada, o teste deve ser repetido. Se mais de um em cada 20 testes estiver fora da faixa, a fonte do erro deve ser investigada.
2. Cada teste deve incluir um poço de meio de cultura sem medicamento antifúngico para demonstrar o crescimento dos organismos em teste e fornecer um controle de turbidez para a leitura dos pontos finais.
3. Subcultive os inóculos em um meio de ágar adequado para garantir a pureza e fornecer colônias frescas, se for necessário realizar um novo teste.
4. Teste cada novo lote de meio, lote de placa de microdiluição e lote de RPMI 2% G com pelo menos duas das cepas de controle de qualidade (disponíveis no site do EUCAST: <http://www.EUCAST.org>) para garantir que as CIMs estão dentro da faixa de concentração esperada.

REFERENCES

- 1 Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51a* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; **47**: 1120-1124.
- 2 Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51a* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**: 1897-1904.
- 3 Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: Epidemiology and detection. *Med Mycol*. 2011; **49 Suppl 1**: S90-95.
- 4 Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009; **15**: 1068-1076.
- 5 Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 2008; **5**: e219.
- 6 Astvad KM, Jensen RH, Hassan TM, et al. First detection of TR46/Y121F/T289A and of TR34/L98H in azole naive patients in denmark despite negative findings in the environment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014.
- 7 van der Linden JW, Jansen RR, Bresters D, et al. Azole-resistant central nervous system aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2009; **48**: 1111-1113.
- 8 Camps SM, van der Linden JW, Li Y, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; **56**: 10-16.
- 9 Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hagen F, Meis JF. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in india. *J Antimicrob Chemother*. 2014; **69**: 555-557.
- 10 Bueid A, Howard SJ, Moore CB, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008

- and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2010; **65**: 2116-2118.
- 11 Rodriguez-Tudela J, Donnelly J, Arendrup M, et al. EUCAST technical note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect.* 2008; **14**: 982-984.
 - 12 Arendrup M, Hope W, Howard S. EUCAST definitive document E.Def 9.2 method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. *EUCAST.* 2014.
 - 13 Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Arendrup MC. EUCAST technical note on voriconazole and aspergillus spp. *Clin Microbiol Infect.* 2013.
 - 14 Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin Microbiol Infect.* 2012.
 - 15 Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, et al. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: A process analysis of test variables. *J Antimicrob Chemother.* 2001; **48**: 163-177.
 - 16 Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; **34**: 1648-1654.
 - 17 Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**: 39-45.
 - 18 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.
 - 19 Anhalt J, Washington I. Preparation and storage of antimicrobials, p. 1199-1200. In Ballows, A (ed), *Manual of Clinical Microbiology.* 1991.
 - 20 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.
 - 21 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.
 - 22 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.
 - 23 Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 2513-2517.
 - 24 Rodriguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Arendrup MC, et al. Comparison of caspofungin MICs by means of EUCAST method EDef 7.1 using two different concentrations of glucose. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**: 3056-3057.
 - 25 Arikian S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; **45**: 327-330.
 - 26 Rodriguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**: 5236-5237.

- 27 Arendrup MC, Howard S, Lass-Flörl C, Mouton JW, Meletiadis J, Cuenca-Estrella M. EUCAST testing of isavuconazole susceptibility in *Aspergillus*: Comparison of results for inoculum standardization using conidium counting versus optical density. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; **58**: 6432-6436.
- 28 Aberkane A, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, et al. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2002; **50**: 719-722.
- 29 Petrikkou E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 1345-1347.
- 30 Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard CLSI document M38-A2. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.* 2008.
- 31 Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C. *J Clin Microbiol.* 1992; **30**: 1000-1004

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-iso-leucina	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 ^a	2,000
L-triptofano	0,005
Glutathione, reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883
Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020

^a Note que o meio contém 0,2% de glicose

Tabela 2. Componentes do meio RPMI 2% G tamponado com MOPS (2x concentrado)

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 hidróxido de sódio 1 M . 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 apropriados das concentrações dos testes para os agentes antifúngicos.

Agente Antifúngico	Solvente	Características	Intervalo do teste (mg/L)
Anfotericina B	DMSO	Hidrofóbico	0,03 --- 16
Anidulafungina	DMSO	Hidrofóbico	0,03 – 16
Caspofungina	DMSO	Hidrofóbico	0,03 – 16
Isavuconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,03 – 16
Itraconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,016 – 8
Micafungina	DMSO	Hidrofóbico	0,03 – 16
Posaconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,016 – 8
Voriconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,03 --- 16

DMSO, Dimetil sulfóxido

Tabela 4. Esquema ISO para preparar as séries de diluição dos antifúngicos com concentração final de 0.0312-16 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	3.200 ^c	Estoque	200	0	3.200	32
2	3.200	Estoque	100	100	1.600	16
3	3.200	Estoque	50	150	800	8
4	3.200	Estoque	50	350	400	4
5	400	Etapa 4	100	100	200	2
6	400	Etapa 4	50	150	100	1
7	400	Etapa 4	50	350	50	0,5
8	50	Etapa 7	100	100	25	0,25
9	50	Etapa 7	50	150	12,5	0,125
10	50	Etapa 7	25	175	6,25	0,06

^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 final de 8 mg/L, iniciar com as concentrações estoques de 1.600 mg/L.

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

Figura 1. Ilustração de como usar o papel preto e branco atrás da placa de microdiluição para ajudar a reconhecer a diferença entre poços transparentes (círculo verde) e poços com crescimento fraco (círculo laranja) ou proeminente (círculo vermelho).



Figura 2. Diferenças micromorfológicas entre um controle de crescimento de *A. fumigatus* não tratado (à esquerda) com crescimento de hifas longas e alinhadas e *A. fumigatus* tratado com caspofungina (à direita) com crescimento de hifas aberrantes/curtas.

