

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

EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 7.4 – Outubro 2023

Versão BrCAST, válida a partir de 13-11-2024

Autores:

J Guinea[#], J. Meletiadis[#], S. Arikan-Akdagli, C. Giske⁵, K. Muehlethaler, M. C. Arendrup 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)

[#] Contribuíram igualmente e compartilham a primeira autoria

Tradução:

Dra. Analy Salles de Azevedo Melo – Professora Afiliada da Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – 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 – Professor Adjunto do Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São Paulo/SP, Médico do Hospital Albert Einstein - São Paulo/SP e Coordenador 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 Membro do Subcomitê de Antifúngicos no Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST)

Dra. Sarah Gonçalves Tavares – Professora Adjunta do Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória/ES e Membro 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, quando o tratamento é falho ou recidivante, quando a resistência intrínseca ou adquirida aos antifúngicos é possível, ou quando a sensibilidade não pode ser prevista com segurança apenas pela 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 sensibilidade dos organismos que apresentam resultados conflitantes em outros testes de sensibilidade (como os testes comerciais), e para determinar a sensibilidade de organismos quando outros testes não são confiáveis ou ainda não 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 (por exemplo 50%, 90%, ou inibição total). A CIM informa sobre a sensibilidade ou a resistência do organismo ao antifúngico, a qual pode ajudar em decisões de tratamento.

Esta atualização do método 7.4 está direcionada para o teste de sensibilidade de leveduras de importância médica (principalmente *Candida* e *Cryptococcus*). A primeira versão deste documento foi publicada como um documento de discussão (7.1) em 2003 [1] e o documento definitivo em 2008 [2]. A segunda versão do documento continha informação adicional a respeito dos solventes para agentes específicos, tempo de estoque para placas contendo equinocandinas, teste de sensibilidade para *Cryptococcus*, e os intervalos de CIM de anidulafungina para cepas de controle de qualidade [3]. A terceira versão introduziu a definição revisada para a categoria I e a seção referente à preparação e calibração do espectrofotômetro foi modificada. Em adição, os alvos e o intervalos dos controles de qualidade foram removidos, reconhecendo o novo documento de controle de qualidade específico disponível no site do EUCAST. Esta quarta versão do documento descreve as modificações necessárias do método EUCAST para testes de sensibilidade antifúngica reprodutíveis da equinocandina rezafungina. A modificação envolve a adição de polissorbato 20 (Tween 20) ao meio líquido para evitar perda variável do fármaco devido à aderência às placas de plástico. Finalmente, os intervalos recomendados de concentrações antifúngicas a serem testados foram atualizados para evitar truncamento nas distribuições de valores de CIM.

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 “sensível” (S), “sensível, exposição aumentada” (I), ou “resistente” (R) para determinados antifúngicos se os pontos de cortes clínicos apropriados estiverem sido estabelecidos. Adicionalmente, a distribuição das CIMs pode ser usada para definir populações fúngicas selvagens ou não-selvagens quando pontos de corte epidemiológicos espécie-específicos (ECOFFs) 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 um grau de conformidade inter-laboratorial, por exemplo, concordância dentro dos intervalos especificados. Como os 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 biológica, sintética ou semi-sintética que inibe o crescimento ou é letal para o fungo. Desinfetantes, antissépticos, ou conservantes não são incluídos nesta definição.
2. **Propriedades dos antifúngicos**
 - a. **Potência.** Fração antimicrobiana ativa de uma substância teste. 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 de 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.** Mínima concentração do antifúngico que inibe o crescimento da levedura em determinado período. A CIM é expressa em mg/L.
5. **Pontos de corte (*breakpoints*).** Valores específicos de CIM nos quais os fungos podem ser classificados nas categorias clínicas “sensível”, “sensível, exposição aumentada”, e “resistente”. Os valores dos pontos de corte podem ser alterados com o surgimento de novas informações (ex.: mudanças na dose de antifúngicos comumente usada) ou quando surgir dados/conhecimentos adicionais.

- a) **S - Sensível, regime de dose padrão:** um microrganismo é categorizado como “sensível, regime de dose padrão”, quando existe alta probabilidade de sucesso terapêutico usando o regime de dosagem padrão do agente antifúngico.
- b) **I – Sensível, exposição aumentada*:** um microrganismo é categorizado como “sensível, exposição aumentada” quando existe 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) **R - Resistente:** um microrganismo é categorizado como “resistente” quando existe uma alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando a exposição ao antimicrobiano é aumentada.
- * Exposição é uma função de como o modo de administração, dose, intervalo entre as doses, tempo de infusão, bem como a distribuição e a excreção do antimicrobiano influenciará o microrganismo no sítio de infecção.
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) Microrganismos não selvagens (*NWT*) podem ter um ou mais mecanismos de resistência, mas dependendo dos valores dos pontos de cortes clínicos (*clinical breakpoints*), microrganismos selvagens (*WT*) e não selvagens (*NWT*) podem ou não responder clinicamente ao tratamento com o agente específico.
- d) O microrganismo selvagem é apresentado como $WT \leq z$ mg/L e o não selvagem como $NWT > z$ 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 como estáveis e definidos fenótipos e/ou genótipos de sensibilidade 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 de 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 leveduras (unidades formadoras de colônias) suspenso 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 sugerem que placas de microdiluição tratadas *versus* não tratadas para tecido produzem valores de CIMs diferentes, pois diversos plásticos podem impactar na interação com o fármaco [4-7]. 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 são, portanto, melhores para produzir valores de CIM similares. A determinação de CIM da rezafungina, seguindo o procedimento padrão, resultou em considerável variabilidade inter-laboratorial [8]; a adição de Tween 20 ao meio de cultura eliminou a variabilidade inaceitável, e os detalhes para preparar o meio de cultura adequado para o teste de sensibilidade antifúngica da rezafungina são fornecidos na seção “Meio”. O método é baseado na preparação de soluções de trabalho de agentes antifúngicos em volumes de 100 µL por poço, aos quais 100 µL de inóculo 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 [9]. O caldo não sintético Antibiotic Medium 3 (AM3), suplementado a uma concentração final de 2% de glicose, foi avaliado para detectar resistência à anfotericina B [10-13]. No entanto, há variação de lote para lote neste meio, e no desempenho do meio de diferentes fabricantes e, conseqüentemente, isso não é recomendado. A utilização de 2%, ao invés do padrão de 0,2%, de concentração de glicose, mostrou resultados com melhor crescimento e facilidade na determinação do ponto final [14]. 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”) como segue abaixo. A adição de Tween 20 no meio especificamente para o teste com a rezafungina é descrito no item 5.

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 (para rezafungina continue no item 5, para outros antifúngicos, pule o item 5 e continue no item 6).
5. Para teste de rezafungina especificamente, complemente o RPMI-2% G duplamente concentrado com Tween 20 puro (CAS No.: 9005-64-5). O Tween 20 deve ser adicionado ao meio duplamente concentrado preparado antes de sua filtração para uma concentração de 0,004% v/v (que resultará em uma concentração final de 0,002% ao adicionar o inóculo). A esterilização por filtração do RPMI contendo Tween 20 em vez da autoclavagem é recomendada para preservar as propriedades do composto e garantir a mistura completa. Vale ressaltar que o Tween 20 é viscoso, o que pode levar à pipetagem de quantidades imprecisas. O seguinte procedimento (aplicável somente ao usar Tween 20 puro com uma densidade de 1,1 g/mL) com uma pré-diluição de Tween 20 é recomendado:
 - a. Prepare 4 mL de uma solução de Tween 20 a 10%:
 - i. Coloque um tubo vazio em uma balança e ajuste para zero.
 - ii. Transfira 400 µL de Tween 20 (temperatura ambiente) para o tubo (de preferência usando uma ponta com um orifício largo ou uma seringa). Observe o peso transferido (densidade 1,1 g/mL, 400 µL = 0,44 g de Tween 20).
 - iii. Adicione a seguinte quantidade de água estéril, corrigindo para pipetagem imprecisa de acordo com a massa e a densidade da seguinte forma (misture bem, pode facilmente espumar).
$$\text{Volume de água para adicionar (mL)} = \frac{3,6 \text{ mL} \times \text{massa do Tween 20 (g) pipetado}}{0,44 \text{ (g)}}$$
 - b. Prepare o meio duplamente concentrado suplementado com Tween 20 (Tween 0,004%):
 - i. adicione 400 µL de Tween 20 a 10% a 1 L de meio.
 - ii. Misture bem e continue para o item 6.
6. Esterilizar por filtração utilizando filtro com poros de 0,22 µm.
7. Armazenar a temperatura de 4°C ou menor por até 6 meses.
8. Para controle de qualidade, use uma alíquota do meio esterilizado para verificar a esterilidade, para retestar 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. Pós

puros 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:

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

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

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 pesada 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 fabricantes/distribuidores. 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. Alguns 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 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 a perda significativa de atividade [15, 16]. As equinocandinas foram previamente consideradas como instáveis a -70°C, entretanto, elas se mantiveram estáveis por pelo menos 6 meses a esta temperatura [16].

Remova os frascos do freezer -70°C e use no mesmo dia que forem descongelados. Descarte qualquer quantidade de antifúngico não utilizado naquele dia. 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.EUCAST.org>). Se necessário, o antifúngico pode ser testado para determinar a potência.

Preparação das soluções de trabalho

O intervalo das concentrações testadas irá depender do organismo e do antifúngico a serem testados. O intervalo das concentrações deve incluir o ponto de corte, se este existir, bem como os resultados esperados para as cepas de controle de qualidade. Os intervalos das concentrações dos antifúngicos recomendados estão na Tabela 3. Séries de diluições de 2 vezes baseadas em 1 mg/L são preparadas em RPMI 2% G, 2x concentrado, que para o teste com rezafungina é suplementado com Tween 20. O meio 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 as recomendações da ISO [17]. Um exemplo de volumes para preparar uma série de diluições com concentrações finais de 0,125-64 mg/L é mostrado nas Tabelas 4 e 5 (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 artificialmente. Colocar o tubo da solução estoque em um agitador por uma hora ou mais antes de continuar o procedimento para resolver este problema.
2. Dispense volumes apropriados do solvente (consulte a Tabela 3 para os tipos de solventes e as Tabelas 4 e 5 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 usadas para o preparo das séries de diluição.
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 os 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 [18].

Preparação das placas de microdiluição

Usar plásticos estéreis, descartáveis, placas de microdiluição com 96 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, com anfotericina B na linha A, dispense na coluna 1 o meio contendo 8 mg/L, na coluna 2 o meio contendo 4 mg/L e assim por diante, até a coluna 11, para o meio contendo 0,008 mg/L.

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

Sendo assim, cada coluna de 1 a 11 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. A coluna 12 conterá o dobro da concentração do meio RPMI 2% G. Note que esta abordagem é apropriada para testar um isolado de levedura numa placa contendo 8 antifúngicos (um em cada linha). É permitido 1 controle negativo (NC) e sete controles de crescimento positivo (PG) colocados na coluna 12, que são usados para determinações de ponto final de inibição de crescimento. Se outra configuração da microplaca for escolhida, por exemplo, um antifúngico por placa a ser testado com vários isolados, deve-se notar que a inclusão de vários controles positivos por isolado facilitará a identificação de contaminações ou outros problemas que potencialmente afetam o resultado negativo.

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 [16]. 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 ressuspendendo 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 $2,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Método de suspensão da colônia

1. Cultive todas as leveduras em ar atmosférico entre 34 e 37°C em meio ágar nutritivo não seletivo (CHROMagar, 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 3 mL 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 absorvância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm e adicione água destilada necessária. Isto dará uma suspensão de leveduras de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Prepare uma suspensão de trabalho pela diluição de 1 para 10 da suspensão padrão em água estéril para obter $1-5 \times 10^5$ UFC/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 (pela contagem de UFC das espécies individuais).

***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 analisadas e comparadas. 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 os testes de sensibilidade para espécies de *Cryptococcus*. Conseqüentemente, 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 DO 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 μ L da suspensão de leveduras $1-5 \times 10^5$ UFC/mL, sem tocar no conteúdo do poço. Este procedimento resultará na concentração do

antifúngico e a densidade do inóculo requeridos (inóculo final = $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Também, inocular nos poços do controle de crescimento (coluna 12), contendo 100 µL de meio estéril livre de antifúngico, com 100 µL da mesma suspensão do inóculo, mas deixe um poço (por exemplo, poço A12) como controle negativo. Preencher este poço 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 µL 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 µL da suspensão em 4,95 mL de água destilada estéril, homogeneizado, e 10 µL 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 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h em ar atmosférico. Uma absorvância $\leq 0,2$ 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 a absorvância permanecer $\leq 0,2$ após 48 h este resultado indica uma falha no teste. Como descrito acima, uma absorvância $\leq 0,2$ após 48 h para *Cryptococcus* spp., o teste deverá ser repetido com incubação a 30°C [19].

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 absorvância da placa é de 530 nm, embora outros possam ser utilizados, por exemplo, 405 nm, 450 nm ou 490 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 do antifúngico que resulta a inibição de 90% do crescimento do fungo quando comparado com controle de crescimento livre de antifúngico.

O ponto final para a inibição de 90% do crescimento é calculado utilizando o valor de DO do controle negativo (CO-CN) e a média dos poços com crescimento positivo (média DO-CP) dos controles, conforme a fórmula:

Determinação do ponto final de DO de 90%: $((\text{media DO-CP}) - (\text{DO-CN})) * 0,1 + \text{CP}$

Flucitosina, agentes azólicos e equinocandinas

A CIM de Flucitosina (5-flucitosina), agentes azólicos e equinocandinas é a menor concentração que resulta em uma inibição de 50% de crescimento do fungo, em comparação com controle de crescimento livre de antifúngico.

O ponto final para a inibição de 50% do crescimento é calculado utilizando o valor de DO do controle negativo (CO-CN) e a média dos poços com crescimento positivo (média DO-CP) dos controles, conforme a fórmula:

Determinação do ponto final de DO de 50%: $((\text{media DO-CP}) - (\text{DO-CN})) * 0,5 + \text{CN}$

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 [20-22] e no site da EUCAST <http://www.EUCAST.org>). Interpretação de CIMs para outras combinações de antifúngicos: organismos na ausência de pontos de corte estabelecidos está mudando e deve ser feito com muito cuidado, levando em consideração dados disponíveis, incluindo experiência clínica, exposição ao antifúngico durante a terapia, etc. Entretanto, a CIM ainda pode fornecer algumas informações sobre sensibilidade, e, de forma importante, gerar dados de CIMs para outras leveduras é um pré-requisito vital para futuras escolhas de valores de pontos de corte e de ECOFF.

CONTROLE DE QUALIDADE

Procedimentos de controle são os meios pelos quais a qualidade dos resultados é assegurada e são descritos em detalhes pelo CLSI [24]. A qualidade dos resultados dos testes é monitorada 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 sensibilidade aos antifúngicos deve ser estável. As cepas controles recomendadas (disponível no website EUCAST <http://www.EUCAST.org>) foram selecionadas de acordo com esses critérios [25,26]. Estudos têm 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 ou diluição seriada correta, e que *C. albicans* ATCC 64548 ou *C. albicans* ATCC 64550 são superiores para este propósito [16,27]. 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. Vale ressaltar que o EUCAST depositou as cepas de referência e controle de qualidade recomendadas na Coleção de Culturas

CCUG da Universidade de Gotemburgo (uma organização sem fins lucrativos), de onde é possível recuperar toda a Coleção (ccug.se) sob o termo de busca AFST.

Estoque das cepas controles

Leveduras isoladas podem ser estocadas como liofilizados ou congelados a -60°C ou inferior [28]. Culturas podem ser estocadas em curto tempo (menos de 2 semanas) sobre ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata dextrose inclinados a $2-8^{\circ}\text{C}$, 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 exemplo, 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 estiverem 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, lote de placas de microdiluição e lote de RPMI 1640-2% G com pelo menos duas cepas controle de qualidade (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 J, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Method for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution offermentative 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 A. 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(7):E246-7.
4. Arendrup MC, Jorgensen KM, Hare RK, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. EUCAST Reference Testing of Rezafungin Susceptibility and Impact of Choice of Plastic Plates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9).
5. Fothergill AW, McCarthy DI, Albatineh MT, Sanders C, McElmeel M, Wiederhold NP. Effects of Treated versus Untreated Polystyrene on Caspofungin In Vitro Activity against Candida Species. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):734-8.
6. Higashitsuji Y, Ueno R, Ogawa M, Ruzicka D. Effects of Culture Conditions (Microplate and Solvent) on in vitro Antifungal Activity of Caspofungin Against Candida Species. *Med Mycol.* 2020;61(1):1-5.
7. Arhin FF, Sarmiento I, Belley A, McKay GA, Draghi DC, Grover P, et al. Effect of polysorbate 80 on oritavancin binding to plastic surfaces: implications for susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1597-603.
8. Arendrup MC, Meletiadiis J, Zaragoza O, Jorgensen KM, Marcos-Zambrano LJ, Kanioura L, et al. Multicentre determination of rezafungin (CD101) susceptibility of Candida species by the EUCAST method. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(11):1200-4.
9. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(9):1648-54.
10. 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(7):2070-4.
11. 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(1):270-2.
12. 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(4):906-9.
13. 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(11):2520-2.
14. 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(3):401-14.
15. Anghalt J. Preparation and storage of antimicrobials. In Ballows, A (ed), *Manual of Clinical Microbiology.* 1991:p. 119-1200.
16. Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, 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 and Chemother.* 2011;55(4):1580-7.
17. ISO. Clinical laboratory testing and in vitro diagnosis test systems - susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility devices - part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobials. Geneva, Switzerland. 2006.

18. Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Lass-Floerl 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(5):1918-20.
19. 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(4):1563-70.
20. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Subcommittee on Antifungal Susceptibility T. EUCAST technical note on Candida and micafungin, anidulafungin and fluconazole. *Mycoses*. 2014;57(6):377-9.
21. Lass-Flörl C, Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Donnelly P, Hope W, et al. EUCAST technical note on Amphotericin B. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):E27-9.
22. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Hope W, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, et al. EUCAST technical note on posaconazole. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(11):E16-7.
23. Astvad KMT, Arikian-Akdagli S, Arendrup MC. A Pragmatic Approach to Susceptibility Classification of Yeasts without EUCAST Clinical Breakpoints. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(2).
24. Clinical and Laboratory Standards Institute W, Pennsylvania. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standar CLSI document M27-A3. 2008.
25. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for Candida species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):819-26.
26. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, 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(5):1104-7.
27. Arendrup MC, Jorgensen KM, Hanemaaijer N, Verweij PE. ISO standard 20776-1 or serial 2-fold dilution for antifungal susceptibility plate preparation: that is the question! *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(7):1793-9.
28. 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(4):816-7.

Tabela 1. Composição do meio RPMI 1640

Constituinte	g/L^a
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 ^b	2,000
L-triptofano	0,005
Glutationa, reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883
Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020

^a Note que o total “massa do pó” é 10,4 g para 1 L de meio RPMI 1640 padrão

^b Note que este meio contém 0,2% de glicose

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.

Para rezafungina, por favor note que o meio deverá ser suplementado com Tween 20, como detalhado na página 6.

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

Agente antifúngico	Intervalo de concentração do teste final (mg/mL)*	Solventes	Características
Anfotericina B	0,004-4	DMSO	Hidrofóbico
Fluconazol	0,03 - 32	DMSO / (Água) ^a	Hidrofóbico
Itraconazol	0,004-4	DMSO	Hidrofóbico
Voriconazol	0,004-4	DMSO	Hidrofóbico
Posaconazol	0,004-4	DMSO	Hidrofóbico
Isavuconazol	0,004-4	DMSO	Hidrofóbico
Anidulafungina	0,004-4**	DMSO	Hidrofóbico
Micafungina	0,004-4**	DMSO	Hidrofóbico
“Rezafungina”	0,008-8**	DMSO	Hidrofóbico
	0,0002 – 0,25		
Flucitosina	0,016 - 16	Água	Hidrofílico

DMSO: dimetil sulfóxido

* Concentração final após inoculação com levedura. Conseqüentemente, a concentração na placa antes da inoculação deve ser duas vezes maior.

^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 dissolvido em DMSO, como recomendado pelo fornecedor (http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F8929|SIGMA&N5=SEARCH_CONC_AT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).

** Os intervalos de concentração recomendados para rezafungina abrangem mais de 11 diluições e, portanto, exigirão 2 linhas na placa de microdiluição (0,0002-0,25 e 0,008-8 mg/L). Se preparadas em placas separadas, o intervalo das maiores concentrações será necessário para as espécies dos complexos *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. fermentati*, enquanto o intervalo das menores concentrações abrange as distribuições do tipo selvagem da maioria das outras leveduras.

“O teste de rezafungina é realizado usando meio suplementado com Tween conforme E.Def 7.4.

Tabela 4. Esquema ISO para preparação de séries de diluição antifúngica com concentração final de 0,004-4 mg/L. Para séries de diluição de 0,03-32 mg/L, veja a Tabela 5. Para séries de diluição com outras faixas, a concentração estoque^a deve ser ajustada adequadamente.

Etapa	Concentração (mg/L)	Fonte	Volume do antifúngico (µL)	Volume do solvente ^b (µL)	Concentração intermediária (mg/L)	Concentração (mg/L) após diluição 1:100 com meio RPMI 2% G (2x concentrado) ^c	Concentração após adição do inóculo
1	800 ^c	Estoque	200	0	800	8	4
2	800	Estoque	100	100	400	4	2
3	800	Estoque	50	150	200	2	1
4	800	Estoque	50	350	100	1	0,5
5	100	Etapa 4	100	100	50	0,5	0,25
6	100	Etapa 4	50	150	25	0,25	0,125
7	100	Etapa 4	50	350	12,5	0,125	0,06
8	12,5	Etapa 7	100	100	6	0,06	0,03
9	12,5	Etapa 7	50	150	3	0,03	0,016
10	12,5	Etapa 7	25	175	1,5	0,016	0,008
11	12,5	Etapa 7	12,5	187,5	0,8	0,008	0,004

^a Para séries de diluição com altas concentrações finais de 16 mg/L ou 8 mg/L iniciar com as concentrações estoque de 3.200 mg/L e 1.600 mg/L, respectivamente.

^b Consultar a Tabela 3 para solventes requeridos para dissolver os antifúngicos.

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

Tabela 5. Esquema ISO para preparação de séries de diluição antifúngica com concentração final de 0,03-32 mg/L. Para séries de diluição de 0,004-4 mg/L, veja a Tabela 4. Para séries de diluição com outras faixas, a concentração estoque^a deve ser ajustada adequadamente.

Etapa	Concentração (mg/L)	Fonte	Volume do antifúngico (µL)	Volume do solvente ^b (µL)	Concentração intermediária (mg/L)	Concentração (mg/L) após diluição 1:100 com meio RPMI 2% G (2x concentrado) ^c	Concentração após adição do inóculo
1	6400 ^c	Estoque	200	0	6400	64	32
2	6400	Estoque	100	100	3200	32	16
3	6400	Estoque	50	150	1600	16	8
4	6400	Estoque	50	350	800	8	4
5	800	Etapa 4	100	100	400	4	2
6	800	Etapa 4	50	150	200	2	1
7	800	Etapa 4	50	350	100	1	0,5
8	100	Etapa 7	100	100	50	0,5	0,25
9	100	Etapa 7	50	150	25	0,25	0,125
10	100	Etapa 7	25	175	12,5	0,125	0,06
11	100	Etapa 7	12,5	187,5	6	0,06	0,03

^a Para séries de diluição com altas concentrações finais de 16 mg/L ou 8 mg/L iniciar com as concentrações estoque de 3.200 mg/L e 1.600 mg/L, respectivamente.

^b Consultar a Tabela 3 para solventes requeridos para dissolver os antifúngicos.

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

Tabela 6. 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% m/v BaCl ₂ x 2 H ₂ O) a 99,5 mL de 0,18 mol/L (0,36 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	Armazene os padrões fechados em temperatura ambiente e protegidos da luz
5	Agitar os padrões completamente no agitador imediatamente antes do uso
6	Renovar os padrões ou checar a sua absorbância após 3 meses