
Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição

Este documento apresenta a seleção e preparação de agentes antifúngicos; implementação e interpretação de testes e requisitos de controle de qualidade para testes de sensibilidade de leveduras que produzem infecções invasivas.

Uma norma de aplicação global desenvolvida mediante processo consensual do NCCLS.





Permission to translate the M27-A2 has been granted to ANVISA by CLSI (Formerly NCCLS). In the event of any variations in meaning that may be introduced through translation, the original NCCLS publication (in English) is authoritative. For each standard, the interpretive data are valid only if the methodology in the standard is followed. NCCLS frequently updates the interpretive tables through new editions and supplements. Users should refer to the most recent edition.

In January 2005, NCCLS changed its name to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Copies of the complete current standards and informational supplement (in English) may be obtained from CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, U.S.A.; telephone: +610.688.0100; fax: +610.688.-700; Internet: www.clsi.org.

The permission granted by NCCLS/CLSI is limited to distribution of M27-A2 by ANVISA to clinical laboratories in Brazil. Permission to reproduce additional copies or otherwise use the text of these documents to an extent not permitted under Copyright Law must be obtained in writing from the Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coordenação da Tradução

Silvia Figueiredo Costa

Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Organização Pan Americana de Saúde

Revisores:

Daniel A. da Matta

Biólogo, Mestre em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias-UNIFESP

Marcia S. C. Melhem

Doutora em Saúde Pública pela USP, Laboratório de Micologia-Instituto Adolfo Lutz

Direitos de Tradução e Reprodução

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Gerencia Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde

NCCLS...

Servindo A Comunidade Mundial das Ciências Médicas Através de Consenso Voluntário

O NCCLS é uma organização internacional interdisciplinar, sem fins lucrativos, educacional e de desenvolvimento de normas/padrões, que promovem o desenvolvimento e uso de normas/padrões e diretrizes consensuais voluntárias na comunidade de atenção à saúde. É reconhecido no mundo inteiro pela aplicação de seu singular processo consensual ao desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes para testes de patologia clínica e questões relacionadas à atenção de saúde. O NCCLS baseia-se no princípio de que o consenso é uma maneira efetiva e custo-eficaz de melhorar os testes clínicos e serviços de atenção à saúde.

Além de desenvolver e promover o uso voluntário de normas/padrões e diretrizes consensuais, fornecemos um foro aberto e isento para tratar questões que afetam a qualidade dos testes de patologia clínica e a atenção à saúde.

PUBLICAÇÕES

Os documentos do NCCLS são publicados como normas/padrões, diretrizes ou relatórios de comitê.

Norma – Documento desenvolvido através do processo de consenso, o qual identifica claramente os requisitos específicos e essenciais dos materiais, dos métodos, ou das práticas a serem usados sem modificações. Uma norma também pode conter elementos discricionários, que são claramente identificados.

Diretriz – Documento desenvolvido através do processo de consenso, o qual descreve critérios para práticas e procedimentos ou materiais operacionais gerais a serem usados de maneira voluntária. Uma diretriz pode ser usada conforme redigida, ou modificada pelo usuário para adequá-las às suas necessidades específicas.

Relatório – Documento que não passou pela revisão consensual e foi publicado pela Diretoria.

PROCESSO CONSENSUAL

O processo consensual voluntário do NCCLS é um protocolo que estabelece critérios formais para:

- autorizar um projeto;
- desenvolver e revisar documentos de maneira transparente;
- revisar documentos em resposta a comentários de usuários;
- aceitar um documento como norma/padrão ou diretriz consensual.

A maioria dos documentos do NCCLS são sujeitos a dois níveis de consenso—“proposto” e “aprovado”. Dependendo da necessidade de avaliação ou coleta de campo, os documentos também podem disponibilizados para revisão em nível consensual intermediário (i.e., “tentativo”).

Proposta – Documento consensual do NCCLS que passa por um primeiro estágio de revisão pela comunidade de saúde como proposta de norma/padrão ou diretriz. O documento deve receber uma revisão técnica abrangente e minuciosa, incluindo a revisão geral de seu escopo, enfoque e utilidade e uma revisão detalhada de seu conteúdo técnico e editorial.

Tentativa -Uma norma/padrão ou diretriz disponibilizada para revisão e comentários apenas quando há necessidade evidente de avaliação de campo de um método recomendado ou de coleta de dados específicos relativos a um protocolo recomendado. Deve ser revisada para assegurar sua utilidade.

Aprovada – Norma/padrão ou diretriz que recebeu aprovação consensual da comunidade de atenção à saúde. Deve ser revisada para avaliação da utilidade do documento final, garantia de consenso (ex., que os comentários relativos a versões anteriores foram satisfatoriamente resolvidos) e identificação de necessidade de documentos consensuais adicionais.

As normas/padrões e diretrizes do NCCLS representam uma opinião consensual sobre boas práticas e refletem um acordo substancial de partes interessadas, competentes e compromissadas materialmente, obtido por meio dos procedimentos consensuais estabelecidos pelo NCCLS. As exigências das normas/padrões e diretrizes do NCCLS podem ser mais ou menos rigorosas do que os respectivos regulamentos. Conseqüentemente, a adoção desse documento consensual voluntário não dispensa o usuário da responsabilidade de obedecer aos regulamentos pertinentes.

COMENTÁRIOS

Os comentários dos usuários são essenciais ao processo consensual. Qualquer pessoa pode apresentar um comentário e todos os comentários são considerados pelo comitê do NCCLS que preparou o documento, em conformidade com o processo consensual. Todos os comentários, incluindo aqueles que resultaram em mudança no documento, quando publicado no próximo nível consensual, bem como aqueles que não resultaram em mudança, são respondidos pelo comitê em apêndice do documento. Incentiva-se os leitores a tecer comentários de qualquer formato e em qualquer oportunidade sobre qualquer documento do NCCLS. Envie seus comentários ao seguinte endereço: NCCLS Executive Offices, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, Estados Unidos.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Os profissionais de saúde de todas as especialidades são instados a participar voluntariamente nos projetos do NCCLS. Para informações adicionais sobre participação nos comitês, favor contatar os Escritórios Executivos do NCCLS.

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica; Norma Aprovada—Segunda Edição

Resumo

A Norma M27-A2—*Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras; à Terapia Antifúngica Norma Aprovada—Segunda Edição* do NCCLS descreve a metodologia de um teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos das leveduras que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo as espécies de *Candida* (e *Candida glabrata*) e *Cryptococcus neoformans*. A norma trata da seleção e preparação dos agentes antifúngicos; da implementação e interpretação dos testes; e do propósito e da implementação dos testes de controle de qualidade. Apresenta também uma análise cuidadosa da responsabilidade dos fabricantes e usuários no controle de qualidade.

NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição*. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

O processo consensual do NCCLS, mecanismo que permite a revisão de um documento, em dois ou mais níveis, pela comunidade de atenção à saúde, é um processo permanente. Os usuários devem prever edições revisadas de qualquer documento. Uma vez que as rápidas mudanças nas tecnologias possam efetuar os procedimentos, métodos e protocolos nas normas/padrões e diretrizes, os usuários devem substituir as edições ultrapassadas pelas edições atualizadas dos documentos do NCCLS. As edições atualizadas estão relacionadas no Catálogo do NCCLS, distribuído às organizações membros e, mediante solicitação, aos não-membros. Se sua organização não é membro do NCCLS e gostaria de ser, assim como para solicitar um exemplar do Catálogo do NCCLS, favor contatar os Escritórios Executivos do NCCLS. Telefone: 610.688.0100; Fax: + 1 610.688.0700; E-Mail: exoffice@nccls.org; Website: www.nccls.org

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a
Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica;
Norma Aprovada—Segunda Edição

Volume 22 Número 15

Michael A. Pfaller, M.D., Presidente
Vishnu Chaturvedi, Ph.D.
Ana Espinel-Ingroff, Ph.D.
Mahmoud A. Ghannoum, M.Sc., Ph.D.
Linda L. Gosey, M.T.(ASCP)
Frank C. Odds, Ph.D., FRC Path.
John H. Rex, M.D.
Michael G. Rinaldi, Ph.D.
Daniel J. Sheehan, Ph.D.
Thomas J. Walsh, M.D.
David W. Warnock, Ph.D., FRC Path.



Esta publicação é protegida por direitos autorais. Nenhuma parte pode ser reproduzida, armazenada em sistema de recuperação, transmitida ou disponibilizada em qualquer formato ou por qualquer meio (eletrônico, mecânico, fotocópia, gravação ou outros) sem consentimento prévio, por escrito, do NCCLS, exceto nos casos relacionados a seguir.

Pelo presente instrumento, o NCCLS concede autorização para reproduzir partes limitadas desta publicação, para uso em manuais de procedimentos laboratoriais, em local único; para empréstimo entre bibliotecas ou para uso em programas educacionais, sempre que as várias cópias dessa reprodução forem distribuídas gratuitamente não contenham, em nenhuma circunstância, mais do que 20% do texto do documento original e inclua o seguinte aviso:

Reproduzido mediante autorização, parte da publicação do NCCLS M27-A2--Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada--Segunda Edição (ISBN 1-56238-469-4). Cópias da atual edição podem ser obtidas no seguinte endereço: NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos.

Autorização para reproduzir ou usar o texto deste documento além das isenções aqui concedidas ou nos termos da Legislação de Direitos Intelectuais pode ser obtida do NCCLS mediante solicitação por escrito. As autorizações podem ser obtidas no seguinte endereço: Executive Director, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos.

Copyright® 2002. The National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Citação Sugerida

(NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição*. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.)

Norma Proposta

Dezembro de 1992

Norma Tentativa

Outubro de 1995

Norma Aprovada

Junho de 1997

Norma Aprovada—Segunda Edição

Agosto de 2002

ISBN 1-56238-469-4

ISSN 0273-3099

Membros do Comitê

Comitê da Área de Microbiologia

James H. Jorgensen, Ph.D.
Presidente

University of Texas Health Center
San Antonio, Texas

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H.
Vice Presidente

Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Subcomitê para Testes de Sensibilidade a Agentes Antifúngicos

Michael A. Pfaller, M.D.
Presidente

University of Iowa College of Medicine
Iowa City, Iowa

Vishnu Chaturvedi, Ph.D.

New York State Department of Health
Albany, New York

Ana Espinel-Ingroff, M.S., Ph.D.

Medical College of Virginia/VCU
Richmond, Virginia

Mahmoud A. Ghannoum, M.Sc., Ph.D.

Center for Medical Mycology, Case Western
Reserve University, and
University Hospitals of Cleveland
Cleveland, Ohio

Linda L. Gosey, M.T.(ASCP)

Food and Drug Administration
Rockville, Maryland

Frank C. Odds, Ph.D., FRC Path.

University of Aberdeen
Escócia, Reino Unido

John H. Rex, M.D.

University of Texas Health Science Ctr. at Houston
Houston, Texas

Michael G. Rinaldi, Ph.D.

University of Texas Health Science Center
San Antonio, Texas

Daniel J. Sheehan, Ph.D.

Pfizer Inc.
New York, New York

Thomas J. Walsh, M.D.

National Cancer Institute
Bethesda, Maryland

David W. Warnock, Ph.D., FRC Path.

Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia

Consultores

Arthur L. Barry, Ph.D.

Clinical Microbiology Institute
Wilsonville, Oregon

Lois M. Schmidt, D.A.
Oficial de Ligação

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Tracy Ann Dooley, M.L.T.(ASCP)

NCCLS

Gerente do Projeto

Wayne, Pennsylvania

Patrice E. Polgar
Editor

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Donna M. Wilhelm
Editor Assistente

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Membros Ativos (em 1º de julho de 2002)

Membros Mantenedores

Abbott Laboratories
American Association for
Clinical Chemistry
Beckman Coulter, Inc.
BD and Company
bioMérieux, Inc.
CLMA
College of American Pathologists
GlaxoSmithKline
Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.
Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
Pfizer Inc
Roche Diagnostics, Inc.

Membros Profissionais

AISAR-Associazione Italiana per lo
Studio degli
American Academy of Family
Physicians
American Association for
Clinical Chemistry
American Association for
Respiratory Care
American Chemical Society
American Medical Technologists
American Public Health Association
American Society for Clinical
Laboratory Science
American Society of Hematology
American Society for Microbiology
American Type Culture
Collection, Inc.
Asociación Española Primera de
Socorros (Uruguay)
Asociación Mexicana de
Bioquímica Clínica A.C.
Assn. of Public Health Laboratories
Assoc. Micro. Clinici Italiani-
A.M.C.L.I.
British Society for Antimicrobial
Chemotherapy
CADIME-Camara De Instituciones
De Diagnostico Medico
Canadian Society for Medical
Laboratory Science—Société
Canadienne de Science de
Laboratoire Médical
Clinical Laboratory Management
Association
COLA
College of American Pathologists
BD Consumer Products

College of Medical Laboratory
Technologists of Ontario
College of Physicians and
Surgeons of Saskatchewan
ESCMID
Fundación Bioquímica Argentina
International Association of Medical
Laboratory Technologists
International Council for
Standardization in Haematology
International Federation of
Clinical Chemistry
Italian Society of Clinical
Biochemistry and Clinical
Molecular Biology
Japan Society of Clinical Chemistry
Japanese Committee for Clinical
Laboratory Standards
Joint Commission on Accreditation
of Healthcare Organizations
National Academy of Clinical
Biochemistry
National Association of Testing
Authorities – Australia
National Society for
Histotechnology, Inc.
Ontario Medical Association
Quality Management Program-
Laboratory Service
RCPA Quality Assurance Programs
PTY Limited
Sociedade Brasileira de Analises
Clinicas
Sociedade Brasileira de
Patologia Clínica
Sociedad Espanola de Bioquímica
Clínica y Patología Molecular
Turkish Society of Microbiology

Membros Governamentais

Association of Public Health
Laboratories
Armed Forces Institute of Pathology
BC Centre for Disease Control
Centers for Disease Control and
Prevention
Centers for Medicare & Medicaid
Services/CLIA Program
Centers for Medicare & Medicaid
Services
Chinese Committee for Clinical
Laboratory Standards
Commonwealth of Pennsylvania
Bureau of Laboratories
General Hospital Vienna (Austria)

Department of Veterans Affairs
Deutsches Institut für Normung
(DIN)
FDA Center for Devices and
Radiological Health
FDA Center for Veterinary
Medicine
FDA Division of Anti-Infective
Drug Products
Iowa State Hygienic Laboratory
Massachusetts Department of
Public Health Laboratories
National Center of Infectious
and Parasitic Diseases (Bulgaria)
National Health Laboratory Service
(South Africa)
National Institute of Standards
and Technology
New York State Department of
Health
Ohio Department of Health
Ontario Ministry of Health
Pennsylvania Dept. of Health
Saskatchewan Health-Provincial
Laboratory
Scientific Institute of Public Health;
Belgium Ministry of Social
Affairs, Public Health and the
Environment
Swedish Institute for Infectious
Disease Control
Thailand Department of Medical
Sciences

Membros na Indústria

AB Biodisk
Abbott Laboratories
Abbott Laboratories, MediSense
Products
Acrometrix Corporation
Ammirati Regulatory Consulting
Anaerobe Systems
Assessor
AstraZeneca
AstraZeneca R & D – Boston, MA
Aventis
Axis-Shield POC AS
Bayer Corporation – Elkhart, IN
Bayer Corporation – Tarrytown, NY
Bayer Corporation – West Haven,
CT
Bayer Medical Ltd.
BD
BD Biosciences – San Jose, CA
Roche Laboratories (Div.

BD Diagnostic Systems	Gen-Probe	Hoffmann-La Roche Inc.)
BD Italia S.P.A.	GlaxoSmithKline	Sarstedt, Inc.
BD VACUTAINER Systems	Greiner Bio-One Inc.	SARL Laboratoire Carron (France)
Beckman Coulter, Inc.	Helena Laboratories	Schering Corporation
Beckman Coulter, Inc. Primary Care Diagnostics	Home Diagnostics, Inc.	Schleicher & Schuell, Inc.
Beckman Coulter K.K. (Japan)	Immunicon Corporation	Second Opinion
Bio-Development SRL	Instrumentation Laboratory	Showa Yakuhin Kako Company, Ltd.
Bio-Inova Life Sciences International	International Technidyne Corporation	Streck Laboratories, Inc.
Bio-Inova Life Sciences North America	IntraBiotics Pharmaceuticals, Inc.	SurroMed, Inc.
BioMedia Laboratories Sdn Bhd	I-STAT Corporation	Synermed Diagnostic Corp.
BioMérieux (NC)	Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, L.L.C.	Sysmex Corporation (Japan)
bioMérieux, Inc. (MO)	Kendall Sherwood-Davis & Geck	Sysmex Corporation - Long Grove, IL
Biometrology Consultants	LAB-Interlink, Inc.	The Clinical Microbiology Institute
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Laboratory Specialists, Inc.	The Toledo Hospital (OH)
Bio-Rad Laboratories, Inc. - France	Labtest Diagnostica S.A.	Theravance Inc.
Biotest AG	LifeScan, Inc. (a Johnson & Johnson Company)	Transasia Engineers
Blaine Healthcare Associates, Inc.	Lilly Research Laboratories	Trek Diagnostic Systems, Inc.
Bristol-Myers Squibb Company	Macemon Consultants	Versicor, Inc.
Canadian External Quality Assessment Laboratory	Medical Device Consultants, Inc.	Vetoquinol S.A.
Capital Management Consulting, Inc.	Merck & Company, Inc.	Visible Genetics, Inc.
Carl Schaper	Minigrip/Zip-Pak	Vysis, Inc.
Checkpoint Development Inc.	Molecular Diagnostics, Inc.	Wallac Oy
Chiron Corporation	mvi Sciences (MA)	Wyeth-Ayerst
ChromaVision Medical Systems, Inc.	Nabi	Xyletech Systems, Inc.
Chronolab Ag	Nichols Institute Diagnostics (Div. of Quest Diagnostics, Inc.)	YD Consultant
Clinical Design Group Inc.	NimbleGen Systems, Inc.	YD Diagnostics (Seoul, Korea)
Clinical Laboratory Improvement Consultants	Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.	
Cognigen	Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.	Associações de Classe
Community Medical Center (NJ)	Norfolk Associates, Inc.	AdvaMed
Control Lab (Brazil)	Novartis Pharmaceuticals Corporation	Association of Medical Diagnostic Manufacturers
Copan Diagnostics Inc.	Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Raritan, NJ)	Japan Association Clinical Reagents Ind. - Tokyo, Japan
Cosmetic Ingredient Review	Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Rochester, NY)	Medical Industry Association of Australia
Cubist Pharmaceuticals	Oxoid Inc.	Membros Associados Ativos
Dade Behring Inc. - Deerfield, IL	Paratek Pharmaceuticals	20 th Medical Group (SC)
Dade Behring Inc. - Glasgow, DE	Pfizer Inc	31 st Medical Group/SGSL (APO, AE)
Dade Behring Inc. - Marburg, Germany	Pharmacia Corporation	67 th CSH Wuerzburg, GE (NY)
Dade Behring Inc. - Sacramento, CA	Philips Medical Systems	121 st General Hospital (CA)
Dade Behring Inc. - San Jose, CA	Powers Consulting Services	Academisch Ziekenhuis-VUB (Belgium)
David G. Rhoads Associates, Inc.	Premier Inc.	Acadiana Medical Laboratories, LTD (LA)
Diagnostics Consultancy	Procter & Gamble Pharmaceuticals, Inc.	Adena Regional Medical Center (OH)
Diagnostic Products Corporation	The Product Development Group	Advocate Healthcare Lutheran General (IL)
Eiken Chemical Company, Ltd.	QSE Consulting	Akershus Central Hospital and AFA (Norway)
Elan Pharmaceuticals	Quintiles, Inc.	Albemarle Hospital (NC)
Electa Lab s.r.l.	Radiometer America, Inc.	Gateway Medical Center (TN)
Enterprise Analysis Corporation	Radiometer Medical A/S	Geisinger Medical Center (PA)
Essential Therapeutics, Inc.	Roche Diagnostics GmbH	Grady Memorial Hospital (GA)
EXPERTech Associates, Inc.	Roche Diagnostics, Inc.	
F. Hoffman-La Roche AG		
Fort Dodge Animal Health	Clarian Health–Methodist Hospital (IN)	
Allegheny General Hospital (PA)		
Allegheny University of the		

Health Sciences (PA)
 Allina Health System (MN)
 Alton Ochsner Medical Foundation (LA)
 American Medical Laboratories (VA)
 Antwerp University Hospital (Belgium)
 Arkansas Department of Health
 ARUP at University Hospital (UT)
 Armed Forces Research Institute of Medical Science (APO, AP)
 Associated Regional & University Pathologists (UT)
 Aurora Consolidated Laboratories (WI)
 Azienda Ospedale Di Lecco (Italy)
 Bay Medical Center (MI)
 Baystate Medical Center (MA)
 Bbaguas Duzen Laboratories (Turkey)
 Bermuda Hospitals Board
 Bo Ali Hospital (Iran)
 British Columbia Cancer Agency (Vancouver, BC, Canada)
 Brooks Air Force Base (TX)
 Broward General Medical Center (FL)
 Calgary Laboratory Services
 Carilion Consolidated Laboratory (VA)
 Cathay General Hospital (Taiwan)
 CB Healthcare Complex (Sydney, NS, Canada)
 Central Peninsula General Hospital (AK)
 Central Texas Veterans Health Care System
 Centre Hospitalier Regional del la Citadelle (Belgium)
 Centro Diagnostico Italiano (Milano, Italy)
 Champlain Valley Physicians Hospital (NY)
 Chang Gung Memorial Hospital (Taiwan)
 Changi General Hospital (Singapore)
 Children's Hospital (NE)
 Children's Hospital & Clinics (MN)
 Children's Hospital Medical Center (Akron, OH)
 Children's Hospital of Philadelphia (PA)
 Children's Medical Center of Dallas (TX)
 Clendo Lab (Puerto Rico)
 Clinical Laboratory Partners, LLC (CT)
 CLSI Laboratories (PA)
 Columbia Regional Hospital (MO)
 Commonwealth of Kentucky
 Community Hospital of Lancaster (PA)
 CompuNet Clinical Laboratories (OH)
 Cook County Hospital (IL)
 Cook Children's Medical Center (TX)
 Covance Central Laboratory Services (IN)
 Danish Veterinary Laboratory (Denmark)
 Danville Regional Medical Center (VA)
 Delaware Public Health Laboratory
 Department of Health & Community Services (New Brunswick, Canada)
 DesPeres Hospital (MO)
 DeTar Hospital (TX)
 Detroit Health Department (MI)
 Diagnosticos da América S/A (Brazil)
 Dr. Everett Chalmers Hospital (New Brunswick, Canada)
 Doctors Hospital (Bahamas)
 Duke University Medical Center (NC)
 E.A. Conway Medical Center (LA)
 Eastern Maine Medical Center
 East Side Clinical Laboratory (RI)
 Eastern Health (Vic., Australia)
 Elyria Memorial Hospital (OH)
 Emory University Hospital (GA)
 Esoterix Center for Infectious Disease (TX)
 Fairview-University Medical Center (MN)
 Federal Medical Center (MN)
 Florida Hospital East Orlando
 Foothills Hospital (Calgary, AB, Canada)
 Fort St. John General Hospital (Fort St. John, BC, Canada)
 Fox Chase Cancer Center (PA)
 Fresenius Medical Care/Spectra East (NJ)
 Fresno Community Hospital and Medical Center
 Frye Regional Medical Center (NC)
 Gambro Healthcare Laboratory Services (FL)
 Guthrie Clinic Laboratories (PA)
 Hahnemann University Hospital (PA)
 Harris Methodist Erath County (TX)
 Harris Methodist Fort Worth (TX)
 Hartford Hospital (CT)
 Headwaters Health Authority (Alberta, Canada)
 Health Network Lab (PA)
 Health Partners Laboratories (VA)
 Heartland Regional Medical Center (MO)
 Highlands Regional Medical Center (FL)
 Hoag Memorial Hospital Presbyterian (CA)
 Holmes Regional Medical Center (FL)
 Holzer Medical Center (OH)
 Hopital du Sacre-Coeur de Montreal (Montreal, Quebec, Canada)
 Hôpital Maisonneuve – Rosemont (Montreal, Canada)
 Hospital for Sick Children (Toronto, ON, Canada)
 Hospital Sousa Martins (Portugal)
 Hotel Dieu Hospital (Windsor, ON, Canada)
 Houston Medical Center (GA)
 Huddinge University Hospital (Sweden)
 Hurley Medical Center (MI)
 Indiana State Board of Health
 Indiana University
 Institute of Medical and Veterinary Science (Australia)
 International Health Management Associates, Inc. (IL)
 Jackson Memorial Hospital (FL)
 Jersey Shore Medical Center (NJ)
 John C. Lincoln Hospital (AZ)
 John F. Kennedy Medical Center (NJ)
 John Peter Smith Hospital (TX)
 Kadlec Medical Center (WA)
 Kaiser Permanente Medical Care (CA)
 Kaiser Permanente (MD)
 Kantonsspital (Switzerland)
 Keller Army Community Hospital (NY)
 Kenora-Rainy River Regional Laboratory Program (Ontario, Canada)
 Kern Medical Center (CA)

Kimball Medical Center (NJ)
 King Faisal Specialist Hospital
 (Saudi Arabia)
 King Khalid National Guard
 Hospital (Saudi Arabia)
 King's Daughter Medical Center
 (KY)
 Klinični Center (Slovenia)
 Laboratories at Bonfils (CO)
 Laboratoire de Santé Publique du
 Quebec (Canada)
 Laboratório Fleury S/C Ltda.
 (Brazil)
 Laboratory Corporation of America
 (NJ)
 Laboratory Corporation of
 America (MO)
 LAC and USC Healthcare
 Network (CA)
 Lakeland Regional Medical Center
 (FL)
 Lancaster General Hospital (PA)
 Langley Air Force Base (VA)
 LeBonheur Children's
 Medical Center (TN)
 L'Hotel-Dieu de Quebec (Canada)
 Libero Istituto Univ. Campus
 BioMedico (Italy)
 Louisiana State University
 Medical Center
 Maccabi Medical Care and Health
 Fund (Israel)
 Magee Womens Hospital (PA)
 Malcolm Grow USAF Medical
 Center (MD)
 Manitoba Health (Winnipeg,
 Canada)
 Martin Luther King/Drew Medical
 Center (CA)
 Massachusetts General Hospital
 (Microbiology Laboratory)
 MDS Metro Laboratory Services
 (Burnaby, BC, Canada)
 Medical College of Virginia
 Hospital
 Medicare/Medicaid Certification,
 State of North Carolina
 Memorial Medical Center (IL)
 Memorial Medical Center (LA)
 Jefferson Davis Hwy
 Memorial Medical Center (LA)
 Napoleon Avenue
 Methodist Hospital (TX)
 Methodist Hospitals of Memphis
 (TN)
 MetroHealth Medical Center (OH)
 Michigan Department of
 Community Health
 Mississippi Baptist Medical Center
 Monte Tabor – Centro Italo -
 Brasileiro de Promocao (Brazil)
 Montreal Children's Hospital
 (Canada)
 Montreal General Hospital
 (Canada)
 MRL Pharmaceutical Services, Inc.
 (VA)
 MRL Reference Laboratory (CA)
 Nassau County Medical Center
 (NY)
 National Institutes of Health (MD)
 Naval Hospital – Corpus Christi
 (TX)
 Naval Surface Warfare Center (IN)
 Nebraska Health System
 New Britain General Hospital (CT)
 New England Fertility Institute
 (CT)
 New Mexico VA Health Care
 Systems
 North Carolina State Laboratory of
 Public Health
 North Kansas City Hospital (MO)
 North Shore – Long Island Jewish
 Health System Laboratories (NY)
 Northwestern Memorial Hospital
 (IL)
 O.L. Vrouwziekenhuis (Belgium)
 Ordre professionnel des
 technologists médicaux du
 Québec
 Ospedali Riuniti (Italy)
 The Ottawa Hospital
 (Ottawa, ON, Canada)
 Our Lady of Lourdes Hospital (NJ)
 Our Lady of the Resurrection
 Medical Center (IL)
 Pathology and Cytology
 Laboratories, Inc. (KY)
 The Permanente Medical Group
 (CA)
 Piedmont Hospital (GA)
 Pikeville Methodist Hospital (KY)
 Pocono Hospital (PA)
 Presbyterian Hospital of Dallas
 (TX)
 Queen Elizabeth Hospital (Prince
 Edward Island, Canada)
 Queensland Health Pathology
 Services (Australia)
 Quest Diagnostics Incorporated
 (CA)
 Quintiles Laboratories, Ltd. (GA)
 Regions Hospital
 Reid Hospital & Health Care
 Services (IN)
 Research Medical Center (MO)
 Rex Healthcare (NC)
 Rhode Island Department of Health
 Laboratories
 Riyadh Armed Forces Hospital
 (Saudi Arabia)
 Royal Columbian Hospital (New
 Westminster, BC, Canada)
 Sacred Heart Hospital (MD)
 Saint Mary's Regional Medical
 Center (NV)
 St. Alexius Medical Center (ND)
 St. Anthony Hospital (CO)
 St. Anthony's Hospital (FL)
 St. Barnabas Medical Center (NJ)
 St-Eustache Hospital (Quebec,
 Canada)
 St. Francis Medical Ctr. (CA)
 St. John Hospital and Medical
 Center (MI)
 St. John Regional Hospital (St.
 John, NB, Canada)
 St. Joseph Hospital (NE)
 St. Joseph's Hospital – Marshfield
 Clinic (WI)
 St. Joseph Mercy Hospital (MI)
 St. Jude Children's Research
 Hospital (TN)
 St. Luke's Regional Medical
 Center (IA)
 St. Mary of the Plains Hospital
 (TX)
 St. Mary's Hospital & Medical
 Center (CO)
 St. Paul's Hospital (Vancouver, BC,
 Montreal)
 St. Vincent Medical Center (CA)
 Ste. Justine Hospital (Montreal, PQ,
 Canada)
 Salina Regional Health Center (KS)
 San Francisco General Hospital
 (CA)
 Santa Clara Valley Medical Center
 (CA)
 Seoul Nat'l University Hospital
 (Korea)
 Shanghai Center for the
 Clinical Laboratory (China)
 South Bend Medical Foundation
 (IN)
 Southwest Texas Methodist Hospital
 (TX)
 South Western Area Pathology
 Service (Australia)
 Southern Maine Medical Center
 Specialty Laboratories, Inc. (CA)
 Stanford Hospital and Clinics (CA)

State of Washington Department of Health
 Stony Brook University Hospital (NY)
 Stormont-Vail Regional Medical Center (KS)
 Sun Health-Boswell Hospital (AZ)
 Sunrise Hospital and Medical Center (NV)
 Swedish Medical Center – Providence Campus (WA)
 Tampa General Hospital (FL)
 Temple University Hospital (PA)
 Tenet Odessa Regional Hospital (TX)
 The Toledo Hospital (OH)
 Touro Infirmary (LA)
 Trident Regional Medical Center (SC)
 Tripler Army Medical Center (HI)
 Truman Medical Center (MO)
 UCSF Medical Center (CA)
 UNC Hospitals (NC)
 University College Hospital (Galway, Ireland)
 University Hospital (Gent) (Belgium)

University Hospitals of Cleveland (OH)
 The University Hospitals (OK)
 University of Alabama-Birmingham Hospital
 University of Alberta Hospitals (Canada)
 University of Colorado Health Science Center
 University of Chicago Hospitals (IL)
 University of Illinois Medical Center
 University of the Ryukyus (Japan)
 University of Texas M.D. Anderson Cancer Center
 University of Virginia Medical Center
 University of Washington
 UZ-KUL Medical Center (Belgium)
 VA (Denver) Medical Center (CO)
 Virginia Department of Health VA (Kansas City) Medical Center (MO)
 VA (Western NY) Healthcare System
 VA (San Diego) Medical Center (CA)

VA (Tuskegee) Medical Center (AL)
 VA Outpatient Clinic (OH)
 Vejle Hospital (Denmark)
 Washington Adventist Hospital (MD)
 Washoe Medical Center Laboratory (NV)
 West Jefferson Medical Center (LA)
 West Shore Medical Center (MI)
 Wilford Hall Medical Center (TX)
 William Beaumont Army Medical Center (TX)
 William Beaumont Hospital (MI)
 Williamsburg Community Hospital (VA)
 Winn Army Community Hospital (GA)
 Winnipeg Regional Health Authority (Winnipeg, Canada)
 Wishard Memorial Hospital (IN)
 Yonsei University College of Medicine (Korea)
 York Hospital (PA)

AUTORIDADES

Donna M. Meyer, Ph.D.,
 Presidente
 CHRISTUS Health

Thomas L. Hearn, Ph.D.,
 Presidente Eleito
 Centers for Disease Control and Prevention

Emil Voelkert, Ph.D.,
 Secretário
 Roche Diagnostics GmbH

Gerald A. Hoeltge, M.D.,
 Tesoureiro
 The Cleveland Clinic Foundation

F. Alan Andersen, Ph.D.,
 Presidente Imediatamente Anterior
 Cosmetic Ingredient Review

John V. Bergen, Ph.D.,
 Director Executivo

MEMBROS DA DIRETORIA

Susan Blonshine, RRT, RPFT,
 FAARC
 TechEd

Wayne Brinster
 BD

Kurt H. Davis, FCSMLS, CAE
 Canadian Society for Medical Laboratory Science

Lillian J. Gill, M.S.
 FDA Center for Devices and Radiological Health

Robert L. Habig, Ph.D.
 Habig Consulting Group

Carolyn D. Jones, J.D., M.P.H.
 AdvaMed

Tadashi Kawai, M.D., Ph.D.
 International Clinical Pathology Center

J. Stephen Kroger, M.D., FACP
 COLA

Willie E. May, Ph.D.
 National Institute of Standards and Technology

Gary L. Myers, Ph.D.
 Centers for Disease Control and Prevention

Barbara G. Painter, Ph.D.
 Bayer Corporation (Retired)

Judith A. Yost, M.A., M.T.(ASCP)
 Centers for Medicare & Medicaid Services

Sumário

Resumo

Membros do Comitê

Membros Ativos

Prefácio

Enfoque de Sistema de Qualidade

1. Introdução
 - 1.1 Abrangência
 - 1.2 Definições

2. Agentes Antifúngicos
 - 2.1 Fontes
 - 2.2 Pesagem de Agentes Antifúngicos
 - 2.3 Preparação de Soluções-Padrão
 - 2.4 Número de Concentrações Testadas
 - 2.5 Seleção dos Agentes Antifúngicos para Testes e Relatório de Rotina

3. Metodologia dos Testes
 - 3.1 Meio Líquido
 - 3.2 Diluições dos Agentes Antifúngicos
 - 3.3 Preparação do Inóculo
 - 3.4 Meio de Inoculação RPMI-1640
 - 3.5 Incubação
 - 3.6 Leitura dos Resultados
 - 3.7 Interpretação dos Resultados
 - 3.8 Modificações nas Microdiluições em Caldo
 - 3.9 Impacto do Tempo de Leitura: 24 horas *versus* 48 horas
 - 3.10 Outras Modificações

4. Controle de Qualidade
 - 4.1 Propósito
 - 4.2 Responsabilidades no Controle de Qualidade
 - 4.3 Seleção das Cepas de Referência
 - 4.4 Armazenamento das Cepas de Referência
 - 4.5 Uso Rotineiro das Cepas de Referência
 - 4.6 Controle dos Lotes de Meio e Material Plástico
 - 4.7 Frequência do Controle de Qualidade
 - 4.8 Outros Procedimentos de Controle
 - 4.9 Cepas de Controle de Qualidade

Referências Bibliográficas

Apêndice A: Meio RPMI 1640

Apêndice B: Padrão de Turbidez de Sulfato de Bário McFarland 0,5

Apêndice C: Diretrizes de Interpretação dos Testes de Sensibilidade *in Vitro* das Espécies de *Candida*

Tabela 1. Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antifúngicos

Tabela 2. Esquema de Preparação de Diluições de Agentes Antifúngicos Solúveis em Água para Uso em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo

Tabela 3. Esquema de Diluição Seriada de Agentes Antifúngicos Insolúveis em Água para Uso em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo

Tabela 4. Limites Recomendados para CIMs de 48 Horas para Quatro Cepas de Referência para Testes de Macrodiluição em Caldo

Tabela 5. Limites Recomendados para CIMs de 24 e 48 Horas para Duas Cepas de Controle de Qualidade para Testes de Microdiluição em Caldo

Tabela 6. Composição do Meio RPMI-1640

Tabela 7. Modificações para Circunstâncias Especiais

Resumo dos Comentários e Respostas do Subcomitê

Resumo dos Comentários dos Delegados e Respostas do Subcomitê

Publicações Afins do NCCLS

Prefácio

Com o aumento da incidência de infecções sistêmicas por fungos e de agentes antifúngicos, cresceu também o interesse em métodos laboratoriais para orientar a seleção da terapia antifúngica. O Comitê da Área de Microbiologia do NCCLS estabeleceu o Subcomitê para Testes de Sensibilidade a Agentes Antifúngicos que, em 1985, publicou seu primeiro relatório, no qual foram apresentados resultados de um questionário e um pequeno estudo colaborativo. Esses resultados são resumidos a seguir.

- Aproximadamente 20% dos membros do NCCLS que responderam e cujos hospitais tinham mais de 200 leitos estavam realizando testes com agentes antifúngicos.
- A metodologia usada na maioria dos testes era a diluição em caldo.
- A maioria das cepas testadas era *Candida albicans* ou outras espécies de leveduras.
- A maioria dos centros testava poucos isolados por ano.
- A concordância dos resultados dos testes de concentração inibitória mínima (CIM), entre os diferentes laboratórios que participaram no estudo colaborativo, era inaceitavelmente, baixa.

Com base nesses achados, o subcomitê concluiu que seria proveitoso desenvolver metodologia mais reprodutível para testes de referência.

Havia um acordo em relação a vários elementos da metodologia. Para facilitar a análise mais apurada das diversas condições de teste, o método de referência deveria ser o teste de macrodiluição em caldo. Devido a exemplos de antagonismos das drogas, por parte de alguns meios de cultura complexos em relação a certos agentes antifúngicos, o subcomitê limitou seu interesse a meios sintéticos completamente definidos. Os procedimentos de preparação e diluição das soluções-padrão das drogas desenvolvidas, anteriormente, para testes com agentes antibacterianos, foram adotados após pequenas modificações.

Embora houvesse acordo em outras áreas, precisava-se de dados adicionais para resolver outras questões. Esses incluíam a preparação do inóculo; tamanho do inóculo; escolha entre os vários meios sintéticos; temperatura de incubação; período de incubação; e definição do ponto final. Essas questões foram objeto de uma série de estudos colaborativos.^{1,2,3,4} Assim, o subcomitê chegou a um acordo sobre todas as questões, o que resultou na publicação da Norma M27-P, em 1992. Nos quatro anos seguintes (1992-1996), estabeleceram-se as faixas de referência de CIM para duas cepas de controle de qualidade para os agentes antifúngicos disponíveis,^{5,6} e disponibilizou-se uma metodologia para o teste de microdiluição em caldo correspondente à do teste de referência por microdiluição em caldo.^{4,7,8,9} Essas informações foram incluídas na norma revisada, publicada em 1995 (M27-T). Em revisão posterior do documento, o subcomitê centrou sua atenção no desenvolvimento de pontos de corte relevantes para os agentes antifúngicos disponíveis¹⁰ incluídos na Norma M27-A (1997). Desde então, o subcomitê desenvolveu as faixas de referência das CIMs de 24 e 48 horas para os testes de microdiluição com agentes antifúngicos, tanto estabelecidos como recém lançados.¹¹ Os resultados desses estudos foram incluídos na atual Norma M27-A2.

Precauções- Padrão

Sendo impossível saber, com frequência, o que é infectante, todos os espécimes de sangue humano devem ser tratados como infectantes e manuseados de acordo com as “precauções-padrão”. Essas são as novas diretrizes que combinam as características principais das práticas de “precauções universais e isolamento de substâncias corpóreas”. As precauções-padrão englobam a transmissão de qualquer patógeno e, por isso, são mais abrangentes do que as precauções universais, que visam apenas aos patógenos transmitidos pelo sangue. As diretrizes relativas às precauções-padrão e precauções universais são disponibilizadas pelo U.S. Centers for Disease Control and Prevention (*Guideline for Isolation Precautions in Hospitals*).

Infection Control and Hospital Epidemiology. CDC. 1996; Vol 17; 1:53-80), (MMWR 1987; 36[suppl 2S] 2S-18S) e (MMWR 1988; 37:377-382, 387-388). No caso de precauções específicas para a prevenção da transmissão laboratorial de infecções transmitidas pelo sangue, por meio de instrumentos e materiais de laboratório, assim como as recomendações relativas à conduta de exposições a sangue, favor reportar-se à edição mais recente do documento M29—*Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* do NCCLS.

Palavras-Chave

Antifúngico, microdiluição em caldo, microdiluição em caldo, teste de sensibilidade, leveduras

Enfoque de Sistema de Qualidade

O NCCLS endossa o enfoque de sistema de qualidade para o desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes, visto que facilita a gestão de projetos; define a estrutura dos documentos por meio de um gabarito; e fornece um processo para identificar os documentos necessários usando a análise de lacunas (*gap analysis*). O enfoque baseia-se no modelo apresentado na edição mais recente do documento HS1—*A Quality System Model for Health Care* do NCCLS. O enfoque de sistema de qualidade aplica-se a um conjunto central de elementos “essenciais dos sistemas de qualidade (EEQS)”, básicos a qualquer organização, a todas as operações em qualquer rota de fluxograma, de qualquer organização prestadora de serviços de atenção à saúde. Os EEQS fornecem um arcabouço para a provisão de qualquer tipo de produto ou serviço, servindo como guia dos gerentes. Os elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQS) são os seguintes.

Elementos Essenciais dos Sistemas de Qualidade--EEQS

Documentos e Registros	Gestão da Informação
Organização	Gestão de Ocorrências
Pessoal	Avaliação
Equipamento	Melhoria de Processos
Compras e Inventário	Serviços e Satisfação
Controle de Processos	Instalações e Segurança

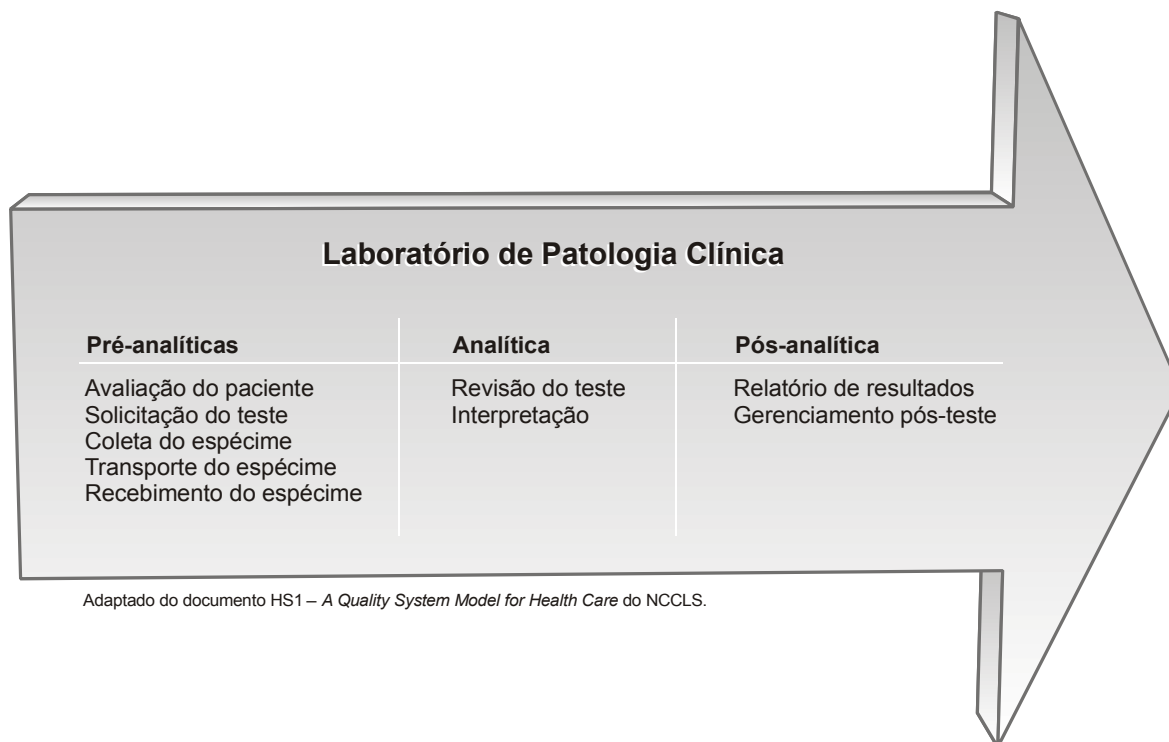
A Norma M27-A2 trata dos seguintes elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQS):

Documentos e Registros	Organização	Pessoal	Equipamento	Compras e Inventário	Controle de Processos	Gestão da Informação	Gestão de Ocorrências	Avaliação	Aprimoramento de Processos	Serviços e Satisfação	Instalações e Segurança
					X						

Tabela adaptada do documento HS1—*A Quality System Model for Health Care* do NCCLS.

Etapa do Fluxograma

Uma etapa do fluxograma é a descrição dos passos necessários para prover um determinado produto ou serviço fornecido pela organização ou entidade. Por exemplo, a Norma GP26-A2 define uma etapa do fluxograma dos laboratórios clínicos que consiste em três passos seqüenciais: pré-analítico, analítico e pós-analítico. Todos os laboratórios clínicos seguem esses três processos para prestar serviços laboratoriais, a saber, informações laboratoriais de qualidade. A seta mostra a seqüência, da esquerda para a direita, que todo laboratório clínico segue. Além disso, os passos ou subprocessos necessários encontram-se relacionados logo abaixo do fluxograma.



A maioria dos documentos do NCCLS está relacionada com os laboratórios de patologia clínica, de maneira que a rota mais comum do fluxograma pode ser representada conforme visto anteriormente. As etapas do fluxograma relativas a outras atividades de atenção à saúde, ex., serviços respiratórios, serviços de imagens, etc., ou a outros tipos de organizações, ex., fabricantes de dispositivos médicos, irão diferir das dos laboratórios de patologia clínica serão diferentes das dos laboratórios de patologia clínica. Toda etapa do fluxograma descreve a seqüência das atividades necessárias à produção dos produtos ou serviços de uma organização ou entidade específica. Para aqueles documentos relacionados com outras etapas do fluxograma, o ícone refletirá passos diferentes do processo.

A Norma M27-A2 focaliza os Seguintes Passos na Etapa do Fluxograma dos Laboratórios de Patologia Clínica

Pré-analíticos					Analíticos		Pós-analíticos	
Avaliação do Paciente	Solicitação do Teste	Coleta do Espécime	Transporte do Espécime	Recebimento do Espécime	Revisão Do Teste	Interpretação Laboratorial	Relatório de Resultados	Gestão do Espécime Pós-teste
					X	X	X	X

Adaptado do documento HS1— A Quality System Model for Health Care do NCCLS.

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica; Norma Aprovada—Segunda Edição

1 Introdução

O método descrito neste documento focaliza os testes para leveduras que causam infecções invasivas. Essas leveduras incluem espécies de *Candida* (incluindo *Candida glabrata*) e *Cryptococcus neoformans*. O método não tem sido usado em estudos com fungos dimórficos em fase leveduriforme, como *Blastomyces dermatitidis* ou *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum*. Outrossim, os testes com fungos filamentosos levantam vários problemas adicionais em sua normatização que não foram resolvidos pela atual metodologia. Foi desenvolvido um método de referência para testes de sensibilidade aos agentes antifúngicos, por diluição em caldo, que foi disponibilizado no documento M38—*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi* do NCCLS.^{13,14}

A Norma M27-A2 é um método de “referência” que está sendo desenvolvido por meio do processo consensual para facilitar a concordância entre laboratórios na determinação da sensibilidade de leveduras a agentes antifúngicos. Uma aplicação importante de métodos de referência é fornecer uma base padrão, a partir da qual outros métodos podem ser desenvolvidos, o que também resultará em reprodutibilidade interlaboratorial com faixa de erro determinada. Por exemplo, os métodos de microdiluição em caldo descritos neste documento, foram configurados para produzir resultados concordantes com aqueles obtidos pelo método de referência. Esse método pode ter vantagens especiais, como: facilidade de execução, economia ou resultados mais rápidos; portanto, seu desenvolvimento pode ser desejável. Se o método produz resultados concordantes com o método de referência, será considerado em conformidade com a Norma M27-A2 do NCCLS.

1.1 Abrangência

Este documento descreve um método para testar a sensibilidade de leveduras que causam infecções, incluindo as espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. Este método não foi validado para a fase leveduriforme de fungos dimórficos, como *Blastomyces dermatitidis* ou *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum*.

O subcomitê focalizou o desenvolvimento dos pontos de corte relevantes para os agentes antifúngicos disponíveis¹¹ e fez referência aos intervalos de CIM para os testes de microdiluição com agentes antifúngicos, tanto estabelecidos, como os recém introduzidos.¹²

1.2 Definições^a

Antibiograma, *n* – Perfil geral dos resultados da sensibilidade antimicrobiana de uma espécie de micróbico a um painel de agentes antimicrobianos.

Concentração inibitória mínima (CIM), *n* – A concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo.

2 Agentes Antifúngicos

2.1 Fonte

^a Algumas destas definições são apresentadas na Norma NRSL8 - *Terminology e Definitions for Use in NCCLS Documents* do NCCLS. Para definições mais completas e informações detalhadas sobre as fontes, favor reportar-se à edição mais recente desse documento.

Os padrões ou substâncias de referência dos antifúngicos podem ser obtidos comercialmente ou diretamente do fabricante.^b Não usar soluções-padrão da farmácia ou outras formulações para uso clínico. As substâncias aceitáveis têm o nome genérico da droga no rótulo, bem como sua potência determinada em ensaios em geral, expressa em microgramas (µg) ou Unidades Internacionais por mg de pó] e a data de vencimento. As substâncias devem ser armazenadas de acordo com as instruções do fabricante, ou a -20° C ou menos, em dessecador (de preferência sob vácuo). Quando o dessecador é retirado do congelador, deve permanecer à temperatura ambiente, antes de ser aberto (para evitar a condensação de água).

2.2 Pesagem das substâncias Antifúngicas

Todos os agentes antifúngicos devem ser submetidos a ensaio para determinar sua potência. A potência determinada no ensaio pode com frequência, varia conforme cada lote de produção da droga. Por isso, o laboratório deve padronizar suas soluções antifúngicas com base nos resultados dos ensaios dos lotes de substâncias antifúngicas que estão sendo usados.

Ambas as equações, a seguir, podem ser usadas para determinar a quantidade de pó ou diluentes necessários para preparar a solução-mãe:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência da substância (}\mu\text{g/mg)}} \quad (1)$$

ou

$$\text{Vol. (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potência da substância (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}} \quad (2)$$

O antifúngico sob forma de pó deve ser pesado em balança analítica calibrada com pesos-padrão de referência do *National Institute of Standards e Technology* (KIST [Gaithersburg, MD]) ou outros aprovados. Em geral, recomenda-se pesar com precisão uma quantidade em excesso do pó necessário e calcular o volume de diluente final para obtenção da concentração desejada final.

Exemplo: Para preparar 100mL de uma solução-padrão contendo 1280µg de agente antifúngico por mL, usando pó antifúngico com potência de 750 µg/mg, utilizar a primeira equação para estabelecer o peso de pó necessário:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{100 \text{ mL} \times 1280 \mu\text{g/mL}}{750 \mu\text{g/mg}} = 170,7 \text{ mg} \quad (3)$$

Visto que é recomendável pesar uma porção de pó em excesso do requerido, coloca-se pó na balança até chegar a 182,6mg. Com essa quantidade de pó pesado, utiliza-se a equação (2), anterior, para determinar a quantidade de diluente necessária:

(4)

^b Nos Estados Unidos, os antifúngicos sob forma de pó ou substância de referência podem ser, também, adquiridos da U.S. Pharmacopoeia (12001 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852).

$$\frac{\text{Volume}}{\text{(mL)}} = \frac{182,6 \text{ mg} \times 750 \text{ } \mu\text{g/mg}}{1280 \text{ } \mu\text{g/mL}} = 107,0 \text{ mL}$$

(Peso do Pó) x (Potência)
(Concentração desejada)

Conc. final

Portanto, os 182,6 mg de antifúngico em pó deverão ser dissolvidos em 107,0 mL do diluente.

2.3 Preparação de Soluções-Padrão

As soluções-padrão de antifúngicos são preparadas em concentrações de, pelo menos, 1280 $\mu\text{g/mL}$ ou dez vezes a concentração mais alta a ser testada, sendo sempre a maior das duas. No entanto, existem alguns agentes antifúngicos de solubilidade limitada que podem requerer concentrações mais baixas. Em todos os casos, as informações fornecidas pelo fabricante da droga devem ser consideradas na determinação da solubilidade.

2.3.1 Uso de Solventes não-aquosos

Algumas drogas devem ser dissolvidas em solventes diferentes da água (ver Tabela 1). As informações sobre solubilidade de um agente antifúngico devem estar anexadas ao produto. Essas drogas devem ser dissolvidas em concentrações 100X mais altas, pelo menos, do que a maior concentração usada no teste. Os agentes, mais freqüentemente, usados incluem: dimetilsulfóxido (DMSO), álcool etílico, polietilenoglicol e carboxi-metil-celulose, todos em qualidade analítica. Quando esses solventes forem empregados, recomenda-se preparar uma *série de diluições* com esses solventes, a partir da solução-mãe, até obtenção de 100 vezes a concentração final. A seguir, cada solução intermediária deverá ser diluída até a concentração final usada no teste (ver a Tabela 1). Esse procedimento impede artefatos resultantes da precipitação de produtos de baixa solubilidade em meio aquoso.

Por exemplo, para preparar uma série de diluições para os testes, contendo uma droga insolúvel em água, mas solúvel em DMSO, cuja maior concentração final é 16 $\mu\text{g/mL}$, pesa-se primeiro 4,8mg (assumindo potência de 100%) do antifúngico em pó que é dissolvido em 3,0mL de DMSO. Isso resulta em solução-padrão de 1.600 $\mu\text{g/mL}$. A seguir, preparam-se mais diluições dessa solução-mãe em DMSO. (Ver as Tabelas 2 e 3). As soluções em DMSO serão diluídas 10X no meio de cultura usado no teste (ver a Seção 3.3) reduzindo a concentração final do solvente para 1%. O DMSO nessa concentração (sem a droga) deve ser usado no teste como controle de diluição.

O exemplo anterior assume uma potência de 100% para o antifúngico em pó. Se a potência for diferente, será necessário aplicar os cálculos fornecidos na Seção 2.2.

2.3.2 Filtragem

Em geral, as soluções-padrão não contém microorganismos contaminantes, podendo-se assumir que são estéreis. Para se ter certeza da esterilidade, é necessário filtrá-las através de uma membrana-filtro. Os filtros de papel, amianto ou vidros sintetizados, que podem absorver quantidades apreciáveis de certos agentes antifúngicos, não devem ser usados. Sempre que se usar filtragem, é importante documentar a ausência de absorção por meio dos resultados de ensaios apropriados.

2.3.3 Armazenamento

Pequenos volumes de soluções-padrão estéreis são colocados em frascos estéreis de polipropileno ou polietileno, selados, cuidadosamente e armazenados (de preferência à temperatura de -60°C ou menores, mas nunca à temperatura superior à -20° C). Os frascos são retirados, conforme necessário, e usados no mesmo dia. Qualquer droga não usada deve ser descartada no fim do dia. As soluções-padrão dos agentes

antifúngicos, em sua maioria, podem ser armazenadas a -60°C , ou menos, durante seis meses ou mais, sem perda significativa de atividade¹². Em todo caso, qualquer orientação fornecida pelo fabricante da droga deve ser considerada como parte destas recomendações gerais e prevalecer sobre qualquer orientação diferente. É indispensável certificar-se de que não há qualquer deterioração significativa do agente antifúngico, o que poderá se refletir nos resultados dos testes de sensibilidade, mediante uso de cepas de controle de qualidade ou cepas de referência, como as relacionadas na Tabela 4.

2.4 Número de Concentrações Testadas

As concentrações a serem testadas devem abranger as concentrações dos pontos de corte e as referentes aos resultados esperados para as cepas controle de qualidade. Com base em estudos anteriores, os seguintes intervalos de concentração das drogas são importantes: anfotericina B – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$; flucitosina – de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$; cetoconazol – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$; itraconazol – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$; fluconazol – de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$; e os novos triazólicos – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$.

2.5 Seleção dos Agentes Antifúngicos para Testes de Rotina e Emissão de Relatórios

Embora pontos de corte já estejam disponíveis para algumas combinações organismo-droga, testes de rotina não são recomendados. Em cada instituição, a decisão sobre realizar ou não, testes de sensibilidade a antifúngicos de rotina, deve ser tomada em conjunto com especialistas em doenças infecciosas, comitê de farmácia, pessoal de microbiologia clínica e comitê de controle de infecções.

2.5.1 Nomes Genéricos

Para minimizar erros, não se deve usar os nomes-comerciais dados pelos fabricantes (ex., usar nome genérico) de todos os agentes antifúngicos.

2.5.2 Número de Agentes Testados

Para que os testes de sensibilidade de rotina sejam relevantes e práticos, o número de agentes antifúngicos testados deve ser limitado. Embora isso não seja uma questão premente no caso dos agentes antifúngicos, o mesmo princípio deve ser aplicado.

2.5.3 Diretrizes para Emissão Seletiva de Relatórios

É válido realizar testes em determinadas circunstâncias: (a) como parte de levantamentos periódicos de série de testes, com vistas a determinar o estabelecimento de perfil de sensibilidade de coleções de isolados patogênicos, provenientes da própria instituição; (b) para auxiliar na determinação da terapia para infecções orofaríngeas refratárias causadas por *Candida* spp, em pacientes cuja terapia com antifúngicos e doses-padrão, parece ter fracassado; e (c) para auxiliar na determinação da terapia para infecções invasivas por *Candida* spp. se a utilidade dos agentes antifúngicos azólicos for indeterminada. Não há pontos de corte disponíveis para interpretar os resultados de testes de qualquer espécie de fungo filamentosos contra qualquer agente antifúngico e a relevância clínica dos testes, com qualquer combinação organismo-droga, permanece incerta (ex., quando a infecção é causada por um isolado não *C. albicans*). Só há pontos de corte disponíveis para *Candida* spp. contra fluconazol, itraconazol e flucitosina, sendo que, a relevância clínica dos testes para qualquer outra combinação organismo-droga permanece incerta. As amostras biológicas para obtenção das culturas e para outros testes devem ser obtidas antes de do início da terapia com antifúngicos.

3 Metodologia dos Testes

3.1 Meio líquido

3.1.1 Meio Sintético

Recomenda-se um meio completamente sintético para os testes de sensibilidade. O meio sintético denominado RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) é considerado satisfatório, ou pelo menos tão adequado quanto vários outros meios sintéticos, tendo sido usado para desenvolver esta norma^{3,4}. A fórmula desse meio é apresentada na Tabela 6 e sua preparação está delineada no Apêndice A.

3.1.2 Solução-Tampão

O meio deve ser tamponado a pH $7,0 \pm 0,1$, em temperatura de 25° C. Deve-se selecionar uma solução-tampão que não antagonize os agentes antifúngicos. A solução-tampão Tris não é satisfatória porque antagoniza a atividade da flucitosina. As soluções-tampão tipo Zwitterion são preferíveis, as que atravessam facilmente a membrana celular, como os fosfatos porque, teoricamente, esses últimos podem produzir interações inesperadas com agentes antifúngicos. Uma solução-tampão considerada satisfatória nos testes de sensibilidade a antifúngicos é o MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0). O pH de cada lote de meio deve ser verificado com um medidor de pH imediatamente após sua preparação; o pH pode variar de 6,9 a 7,1 à temperatura ambiente (25° C). Os valores de CIM de cada lote de meio de cultura devem ser avaliados usando um painel de organismos de controle de qualidade (ver a Seção 4).

3.2 Preparação de Diluições de Agentes Antifúngicos

Os diferentes procedimentos de preparação e armazenamento de soluções de agentes antifúngicos são os seguintes.

- (1) Usar tubos de ensaio plásticos e estéreis, 12 x 75mm para preparar e realizar os testes.
- (2) Usar um poço para controle do crescimento contendo meio sintético RPMI-1640 sem agente antifúngico (mas, com solvente não aquoso, quando pertinente) para cada organismo testado.
- (3) Fechar os tubos com tampas de rosca de plástico ou metal.

3.2.1 Agentes Antifúngicos Solúveis em Água

Quando se precisa realizar diluição seriada em razão 2 dos agentes antifúngicos solúveis em água, estas podem ser preparadas volumetricamente em meio líquido (Tabela 2). O procedimento para os agentes antifúngicos não-solúveis em água é diferente do empregado para agentes solúveis em água e encontra-se descrito a seguir. Para fazer um número pequeno de testes, recomenda-se consultar a metodologia descrita na Tabela 3.

O volume total de cada solução a ser preparada depende do número de testes a serem realizados. Visto que se usa 0,1mL de cada concentração da droga antifúngica para cada teste, 1,0mL de solução será suficiente para pipetar o necessário para nove testes. Utiliza-se apenas uma pipeta para os diluentes e, a seguir, acrescentar a solução-padrão do antifúngico ao primeiro tubo de ensaio. Emprega-se uma pipeta separada para cada diluição restante dessa série. Uma vez que a diluição das drogas será de 1:10 quando combinadas com o inóculo, as soluções de trabalho de agente antifúngico são 10X mais concentradas do que as concentrações finais.

Muitas pessoas acreditam que trabalhar com diluições 1:10 (conforme indicado na Tabela 2) é fácil e conveniente. Entretanto, algumas pipetas automatizadas dispensam apenas volumes de 1,0 ou 0,1mL. Assim, a razão 1:11 seria preferível. Não é importante se o volume final do teste é 1,0mL ou 1,1mL. Quando se efetuam diluições 1:11, o esquema de diluição deve ser alterado de maneira a obter as mesmas concentrações finais da droga.

3.2.2 Agentes Antifúngicos Insolúveis em Água

No caso dos agentes antifúngicos cujas soluções-padrão não podem ser preparadas em água, como cetoconazol, anfotericina B, itraconazol ou os novos azólicos, deve-se preparar uma série de diluições do agente em solvente apropriado, sendo a primeira 100X a concentração final (ver a Seção 2.3.1). A seguir, cada solução não aquosa deve ser diluída 10X em caldo RPMI-1640.

Por exemplo, quando se deseja uma série de diluições com concentrações finais na faixa de 16µg/mL a 0,0313µg/mL, prepara-se primeiro uma série de concentrações de 1.600 a 3,13µg/mL em DMSO (ver a Seção 2.3.1). Para preparar volumes de 1mL de agente antifúngico diluído (suficiente para dez testes), pipeta-se primeiro volumes de 0,9mL do meio RPMI-1640 em cada tubo de ensaio estéril, em total de onze. Com auxílio de uma única pipeta, acrescenta-se 0,1mL de DMSO puro a uma alíquota de 0,9mL de meio de cultura (controle de esterilidade do meio); a seguir, pipeta-se 0,1mL da menor concentração (3,13µg/mL) da droga diluída em DMSO, a o outro tubo com 0,9 mL de meio de cultura, seguindo com 0,1mL da concentração 6,25µg/mL e assim sucessivamente, por toda a série de concentrações, acrescentado-se cada vez, 0,1mL da solução de antifúngico aos volumes de 0,9mL de meio. Esses volumes podem ser ajustados, se necessário, dependendo do número total de testes a serem realizados. Visto que haverá uma diluição 1:10 das drogas quando combinadas com o inóculo, as soluções de trabalho dos agentes antifúngicos são 10X mais concentradas do que as concentrações finais.

3.3 Preparação do Inóculo

As diferentes operações de preparação do inóculo são as seguintes.

(1) Deve-se realizar a subcultura (repique) dos organismos, em tubos estéreis com ágar Sabouraud-dextrose ou ágar batata-dextrose, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação deve permanecer em 35° C.

(2) O inóculo deve ser preparado escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de \approx 1mm de cultura de 24 horas para espécies de *Candida* ou cultura de 48 horas para *C. neoformans*. As colônias devem ser suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%).

(3) A suspensão resultante deve ser colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 (ver o Apêndice B), em comprimento de onda de 530nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. A suspensão de trabalho é produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL².

3.4 Inoculação do meio RPMI-1640

Antes de ajustar o inóculo, coloca-se 0,1mL de cada uma das diferentes concentrações de agente antifúngico em tubos de ensaio 12 x 75mm. Para controle de crescimento coloca-se 0,1mL do diluente da droga, sem agente antifúngico. Dentro de 15 minutos após padronizar o inóculo (até duas horas, se o inóculo for mantido a 4° C), acrescenta-se e homogeneiza-se 0,9mL do inóculo ajustado, a cada tubo de ensaio da série de concentrações. Isso resulta em diluição 1:10 de cada concentração de antifúngico e uma diluição do inóculo em 10%.

3.5 Incubação

Com exceção de *C. neoformans*, os tubos são incubados (sem agitação) a 35° C, durante período de 46 a 50 horas, em ar ambiente. Nos testes com *C. neoformans*, os tubos devem ser incubados por período total de 70 a 74 horas, antes de se determinar os resultados.

3.6 Leitura dos Resultados

A quantidade de crescimento nos diferentes tubos contendo o agente antifúngico é comparada, visualmente, com a quantidade de crescimento no tubo controle de crescimento para cada levedura (sem agente) usado em cada série de testes, da seguinte maneira.

3.6.1 Anfotericina B

Para anfotericina B, os pontos finais da reação são, claramente, definidos, sendo fácil distinguir a CIM como a menor concentração de droga que impede qualquer grau de crescimento discernível. Em geral, não são vistos pontos finais da reação mal definidos.

3.6.2 Antifúngicos Flucitosina e Azólicos

Para flucitosina e especialmente para os azólicos, como fluconazol e cetoconazol, os pontos finais da reação são menos claramente, definidos do que os descritos para anfotericina B, o que pode constituir uma fonte substancial de variabilidade. O uso de pontos finais menos rigorosos (aceitando alguma turbidez acima da CIM) tem melhorado a concordância entre laboratórios, além de discriminar entre isolados, supostamente, sensíveis e isolados resistentes. Quando a turbidez persiste, acima da CIM, é freqüentemente, idêntica para todas as concentrações da droga. O grau de turbidez aceito pode ser estimado diluindo-se 0,2mL da suspensão do controle de crescimento, isento da droga, em 0,8mL do meio de cultura, produzindo um padrão de inibição de 80%.^{5,16} Mesmo a dispersão de grumos, que pode se tornar evidente após incubação, pode fazer com que a determinação do ponto final seja mais reprodutível. Além disso, deve-se usar cepas de referência com sensibilidade pré-definida para a capacitação do pessoal novato do laboratório.

3.7 Interpretação dos Resultados

Os pontos de corte (*breakpoints*) para interpretação dos resultados só foram estabelecidos para algumas combinações organismo-droga (ver o Apêndice C). A relevância clínica dos testes com outras combinações organismo-droga continua incerta, mas as informações mais relevantes podem ser resumidas conforme segue.

3.7.1 Anfotericina B

Até agora, a experiência usando os testes descritos nesta Norma indica que as CIMs da anfotericina B, para isolados de *Candida* spp., apresentam-se agrupados em pequeno intervalo entre 0,25 e 1,0µg/mL. Quando os isolados que parecem resistentes à anfotericina B em modelos animais são testados usando os métodos da Norma M27, é possível obter valores de CIM superiores a 1µg/mL. Infelizmente, a metodologia da Norma M27 não permite a detecção desses isolados de maneira consistente e tudo que se pode concluir, no presente momento, é que quando se obtém um valor de CIM de anfotericina B >1µg/mL para um isolado de *Candida* spp., é provável que o isolado seja resistente à anfotericina B. Pesquisas em andamento sugerem que testes com *Antibiotic Medium 3* suplementado com glicose (dextrose) a 2% permitem maior confiabilidade na detecção dos isolados resistentes.^{17,18} Entretanto, a reprodutibilidade desse método ainda está sendo estudada¹⁹ e os laboratórios que decidirem realizar esses testes devem comparar, cuidadosamente, seus resultados com aqueles obtidos com isolados com resposta conhecida à anfotericina B. Uma coleção de isolados de referência, com utilidade potencial foi depositada na *American Type Culture Collection* (ATCC®): *C. lusitaniae* ATCC® 200950; ATCC® 200951, ATCC® 200952, ATCC® 200953, ATCC® 200954; *C. albicans* ATCC® 200955; e *C. tropicalis* ATCC® 200956.

3.7.2 Flucitosina

Os pontos de corte para a interpretação dos resultados com *Candida* spp. e flucitosina foram estabelecidos com base, em grande parte, na farmacocinética da droga (ver o Apêndice C).

3.7.3 Fluconazol

Com base em grande acervo de dados do fabricante de fluconazol¹¹ foram estabelecidos pontos de corte para a interpretação dos resultados com *Candida* spp. e fluconazol (ver o Apêndice C). Esses dados são provenientes, principalmente, de estudos com casos de candidíase orofaríngea e infecções invasivas por *Candida* spp., em pacientes não-neutropênicos, sendo incerta sua relevância clínica em outros contextos. Além disso, esses pontos de corte de interpretação não se aplicam à *C. krusei* e, portanto, é imprescindível identificar a espécie, antes de determinar a CIM. A utilidade dos testes com isolados de *C. neoformans* está sendo intensamente estudada e dados recentes sugerem correlação entre CIMs elevadas e fracasso clínico.²⁰

3.7.4 Cetoconazol

Até agora, a experiência usando os testes descritos nesta Norma indicam que valores de CIM para leveduras variam de 0,03 a 16µg/mL. Entretanto, ainda não há dados indicando correlação entre CIM e resultados de tratamento com cetoconazol.

3.7.5 Itraconazol

Com base em grande quantidade de dados do fabricante de fluconazol¹¹ foram estabelecidos pontos de corte para a interpretação dos resultados de testes com *Candida* spp. e itraconazol (ver o Apêndice C). Esses dados são provenientes, principalmente, de estudos de candidíase orofaríngea, sendo incerta sua relevância clínica em outros contextos. Além disso, é impossível ressaltar, de modo convincente a importância da preparação correta das diluições do itraconazol, dado que é um produto insolúvel. O uso de solventes incorretos ou desvios no esquema de diluições sugerido na Tabela 3 pode levar a erros substanciais, causados por artefatos de diluição.

3.7.6 Novos Triazóis

Até agora, a experiência com posaconazol, ravuconazol e voriconazol usando os testes descritos nesta Norma, indica que os valores de CIM para leveduras variam de 0,03 a 16µg/mL, sendo que, a maioria dos isolados é inibida a $\leq 1\mu\text{g/mL}$ de quaisquer dos três agentes. Entretanto, ainda não há dados indicando correlação entre CIM e resultados de tratamento com estes agentes.

3.8 Modificações para Microdiluição

Há volume substancial de dados publicados documentando excelente concordância entre os resultados obtidos com a metodologia de macrodiluição descrita anteriormente, e uma adaptação para microdiluição^{5,8-10,21-24}. A facilidade de execução dos testes de microdiluição é muito interessante, sendo que a maioria dos laboratórios de patologia clínica, provavelmente, decidirá implementar este método ao invés do método de macrodiluição. Os passos e as condições de teste relevantes ao teste de microdiluição são aqui discutidos de maneira detalhada.

As concentrações 10X da droga, descritas para o teste de macrodiluição, devem ser diluídas à 1:5 com RPMI para se conseguir concentração 2X necessária para o teste de microdiluição. As suspensões dos inóculos são preparadas e ajustadas conforme descrito para os testes de macrodiluição. A suspensão-padrão de levedura é misturada durante 15 segundos em vórtex, diluída 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura, para se obter o inóculo 2X concentrado usado no teste (de 1×10^3 a 5×10^3 CFU/mL). O inóculo

(2X) será diluído a 1:1 quando os poços forem inoculados, chegando-se à concentração final desejada de inóculo (de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ CFU/mL).

O teste de microdiluição é realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U). As concentrações 2X da droga são dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100µL, com uma pipeta multicanal. A fileira 1 deverá conter a maior concentração da droga (64 ou 16µg/mL) e a fileira 10 a menor concentração da droga (0,12 ou 0,03µg/mL). Essas placas podem ser cobertas com filme plástico, colocadas em sacos de plástico e armazenadas congeladas à temperatura -70°C , por até seis meses, sem deterioração da potência da droga. Cada poço da placa de microdiluição é inoculado, no dia do teste, com 100µL da correspondente suspensão 2X concentrada do inóculo, o que leva às diluições das drogas e à concentração do inóculo antes mencionados. Os poços controle de crescimento contêm 100µL de meio estéril, isento de droga, e são inoculados com 100µL das suspensões 2X concentradas dos inóculos. Os organismos de CQ são testados da mesma maneira e são incluídos toda vez que se testa um isolado. A fileira 12 da placa de microdiluição pode ser usada para efetuar o controle da esterilidade (apenas meio isento de drogas).

As placas de microdiluição são incubadas a 35°C , observando presença ou ausência de crescimento visível. A agitação das placas pode simplificar a leitura dos pontos finais. Os poços de microdiluição recebem uma pontuação (escore) o crescimento em cada poço é comparado com o do poço controle do crescimento (isento de droga) com auxílio de um espelho de leitura;. A seguir, cada poço da placa de microdiluição recebe um valor numérico, usando a seguinte escala: 0 = opticamente claro; 1 = crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento; e 4 = nenhuma redução do crescimento. Quando a formação de grumos na suspensão prejudica a determinação da pontuação dos poços, deve-se tentar pipetar, agitar em vórtex ou outra técnica de homogeneização^{24,25}. O valor de CIM de anfotericina B é definido como a menor concentração em que se observa o escore 0 (opticamente claro), sendo o CIM de 5-FC e de azóis definido como a menor concentração em que se observa o escore 2 (redução proeminente de crescimento). Uma diminuição proeminente de turbidez corresponde à, aproximadamente, 50% da inibição do crescimento, determinado em espectrofotômetro. Os resultados da microdiluição com leitura de CIM realizada em 48 horas (72 horas, para a maioria dos isolados de *C. neoformans*) têm maior concordância com o método de referência por macrodiluição em caldo^{23, 24,26}

3.9 Impacto do Tempo de Leitura: 24 Horas versus 48 Horas

A metodologia da Norma M27-A2 para *Candida* recomenda ponto final de leitura após 48 horas. Para a maioria dos isolados, a diferença entre leitura após 24 horas e após 48 horas é mínima e não altera a categoria de interpretação (i.e., não muda a classificação do isolado como “sensível” ou “resistente”). Entretanto, pesquisa recente indicou inclusão de leituras após 24 horas porque: (a) é possível, com frequência, ler CIM após 24 horas e (b) leituras após 24 horas podem ser mais relevantes, do ponto de vista clínico, no caso de alguns isolados. Os isolados cuja leitura precoce é importante são os que apresentam aumento dramático de CIM, das 24 horas para as 48 horas, devido ao crescimento indefinido (denominado *trailing*) e significativo (inibição parcial do crescimento, ao longo de um amplo intervalo de concentrações do antifúngico). Com ocorrência estimada em, aproximadamente, 5% dos isolados²⁷ esse crescimento indefinido pode ser suficiente para fazer com que um isolado que parecia sensível às 24 horas, se torne completamente resistente após 48 horas. Duas pesquisas *in vivo* sobre esse fenômeno e independentes entre si, empregando candidíase murina disseminada como modelo^{27,28}, demonstraram que os isolados com esse tipo de comportamento devem ser classificados como “sensíveis”, ao invés de “resistentes”. Esse conceito foi corroborado pela demonstração de que o crescimento indefinido pode ser eliminado diminuindo o pH do meio de teste para 5 ou menos²⁹ e, também, pela demonstração clínica de que a candidíase orofaríngea causada por tais isolados responde à dose menor de fluconazol do que a usada para tratar isolados sensíveis típicos³⁰. À luz dessas observações, são fornecidos os intervalos de CIM, para ambas as leituras, de 24 e 48 horas, em testes de microdiluições, para duas cepas de CQ e oito agentes antifúngicos sistêmicos (Tabela 5).

3.10 Outras Modificações

Além dos esforços em andamento para simplificar os testes descritos nesta Norma, foram desenvolvidas algumas modificações mais fundamentais do método, em resposta a problemas específicos, as quais encontram-se descritas na Tabela 7. Essas modificações não fazem parte da atual metodologia, mas os laboratórios interessados podem ter interesse em explorar sua relevância clínica.

4 Controle de Qualidade

4.1 Propósito

As metas do programa de controle de qualidade são monitorar os seguintes elementos:

- precisão e acurácia da metodologia dos testes de sensibilidade;
- desempenho dos reagentes, condições de teste e instruções usadas no teste; e
- desempenho das pessoas que realizam os testes e lêem os resultados.

Embora outros fatores também intervenham, a melhor maneira de alcançar essas metas está no uso de medidas de controle de qualidade e cepas de referência, selecionadas por sua estabilidade genética e utilidade no método específico sob controle⁶.

4.2 Responsabilidades no Controle de Qualidade

4.2.1 Fabricantes (Produtos Comerciais e/ou “Internos”)

Os fabricantes são responsáveis pelos seguintes elementos:

- estabilidade dos antifúngicos;
- identificação dos antifúngicos;
- potência das soluções padrão;
- adesão às boas práticas de fabricação;
- integridade do produto; e
- responsabilidade e rastreabilidade a um consignatário.

4.2.2 Laboratório (Usuário)

O laboratório é responsável pelos seguintes elementos:

- armazenamento (deterioração da droga);
- proficiência do operador; e
- adesão à metodologia (ex., efeito do inóculo, condições de incubação [tempo e temperatura]).

4.2.3 Responsabilidades Mútuas

Os fabricantes devem desenhar e recomendar um programa de controle de qualidade que permita que o usuário avalie as variáveis (ex., níveis de inóculo, condições de armazenamento/transporte) prováveis de causar problemas no bom desempenho laboratorial e determine se o ensaio tem desempenho correto, quando executado de acordo com as instruções de uso.

4.3 Seleção das Cepas de Referência

As cepas de referência ideais para o controle de qualidade dos métodos de diluição têm valores de CIM próximos aos situados no meio do intervalo de concentrações, para todos os agentes antifúngicos testados. Uma cepa-controle ideal é inibida na quinta diluição de uma série $-\log_2$ de nove diluições, mas as cepas com CIM entre a terceira e sétima diluições são aceitáveis. Antes de ser aceita como referência, a cepa deve ser testada, pelo período que for necessário, até demonstrar que seu perfil de sensibilidade aos agentes antifúngicos é, geneticamente, estável. A Norma M23 - *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters* do NCCLS fornece diretrizes para seleção de cepas-controle de qualidade apropriadas e para determinação de intervalos de valores aceitáveis de CIM. As cepas de CQ relacionadas nas Tabelas 4 e 5 foram selecionadas de acordo com esses critérios.^{6,7,12}

4.4 Armazenamento das Cepas de Referência

4.4.1 Métodos de Armazenamento para Prazos Curto e Prolongado

As cepas de referência são armazenadas de maneira a minimizar a possibilidade de sua mutação.

- Há dois métodos de preferência para o armazenamento prolongado de cepas de referência. As leveduras podem ser cultivadas em ágar batata-dextrose e depois congeladas a -70°C , conforme descrito por Pasarell e McGinnis.³¹ Alternativamente, as cepas de referência (embora, não espécies de *Cryptococcus*) podem ser preservadas suspendendo as células fúngicas em solução de glicerol a 50% em pequenos frascos e armazenando-as a 70°C .
- Para armazenamento de curto prazo, as culturas-padrão de trabalho devem ser cultivadas em tubos de ágar Sabouraud ou ágar dextrose peptona inclinados até se observar crescimento suficiente, sendo depois armazenadas à temperatura de 2 a 8°C . Os repiques são preparados a cada duas semanas pelo método de transferência seriada. Para evitar a mistura de culturas, recomenda-se não realizar mais do que três passagens após a retirada da cepa padrão congelada. Deve-se obter uma cultura-padrão nova sempre que ocorrerem resultados aberrantes.

4.4.2 Fontes de Cepas de Referência

As cepas de referência devem ser obtidas de fontes que possam fornecer informações acerca da origem da cultura (por exemplo, da empresa *American Type Culture Collection* [ATCC[®]],^c de fontes comerciais com história documentada da cultura, ou de instituições de referência com capacidade comprovada de armazenar e usar os organismos de maneira compatível com risco mínimo de contaminação).

4.4.3 Preparação das Cepas para Armazenamento

Para preparar as cepas para armazenamento, deve-se obedecer ao seguinte procedimento:

- (1) Cultivar os organismos em placas de Petri, durante a noite, em ágar Sabouraud-dextrose, ou em ágar batata-dextrose, ou ágar enriquecido com digerido de soja-caseína.

^c ATCC é marca registrada da American Type Culture Collection.

- (2) Selecionar o crescimento de várias colônias e realizar testes de sensibilidade apropriados, para demonstrar resultados esperados de CIM (ver a Tabela 4 para as CIMs esperadas de algumas cepas de referência).
- (3) Realizar uma subcultura das cepas, que produziram os resultados esperados, no mesmo meio usado para a cultura primária e incubar durante período longo para que ocorra crescimento suficiente (em geral, de um a três dias).
- (4) Examinar com cuidado o crescimento resultante para se certificar da pureza da cultura.
- (5) Suspender o crescimento na solução estabilizante até fazer suspensão densa (ou, se estiver liofilizado, suspender o crescimento no meio apropriado).
- (6) Distribuir pequenos volumes (uma ou duas gotas) da suspensão turva em recipientes estéreis adequados.
- (7) Colocar esses recipientes em congelador, mantidos conforme indicado na Seção 2.3.3, ou em nitrogênio líquido.

As suspensões-padrão, preparadas de acordo com o procedimento delineado anteriormente, podem ser mantidas indefinidamente, sem risco significativo de alteração nos perfis de sensibilidade ao agente antifúngico. Quando o estoque de recipientes estiver praticamente exaurido, repete-se o processo para produzir um novo estoque.

4.5 Uso Rotineiro das Cepas de Referência

Para o uso rotineiro das cepas de referência, é necessário realizar os seguintes procedimentos:

- (1) Retirar o recipiente da cultura do congelador ou obter um frasco liofilizado.
- (2) Deixar descongelar a suspensão congelada ou reidratar a cultura liofilizada.
- (3) Realizar uma subcultura em placas contendo ágar batata-dextrose e incubá-las a 35° C durante 24 horas, para as espécies de *Candida*, ou 48 horas para *C. neoformans*.
- (4) Retirar quatro ou cinco colônias, realizar subculturas no meio para os testes de sensibilidade apropriados e, a seguir, realizar subculturas em tubos contendo ágar inclinado, enriquecido com digerido de soja-caseína.
- (5) Após incubar as cepas durante a noite, elas devem ser armazenadas à temperatura de 2 a 8° C.
- (6) Realizar as subculturas, em placa contendo ágar, a partir do tubo com ágar inclinado.
- (7) Realizar sempre os testes de sensibilidade das colônias de placas cultivadas durante uma noite.

Os tubos com ágar inclinado podem ser usados como culturas-padrão de trabalho. Esses tubos devem ser substituídos de duas em duas semanas, pelo menos, por novos tubos do estoque congelado.

4.6 Controle de Lotes do Meio e Equipamento de Plástico

Para controle de lotes de meio de cultura e de artigos plásticos, o procedimento pode ser dividido nos seguintes passos:

- (1) Testar cada novo lote de meio usado em tubos de macrodiluição, ou lote de placas de microdiluição, usando uma das cepas-controle de qualidade relacionadas na Tabela 4, para determinar se os valores de CIM estão dentro do intervalo esperado; caso contrário, rejeitar o lote.
- (2) Pelo menos um tubo de cada lote deve ser incubado, sem inocular, durante o mesmo período necessário para realizar o teste, de maneira a verificar a esterilidade do meio.
- (3) Os lotes novos do meio RPMI-1640 devem ser testados para verificar se seu desempenho será aceitável, antes de usá-los em testes de isolados clínicos, visto que estudos recentes demonstram que alguns lotes não têm desempenho adequado. O pH pode variar de 6,9 a 7,1 (ver a Seção 3.1.2).
- (4) Registrar os números de lote de todos os materiais e reagentes usados nesses testes.

4.7 Freqüência dos Testes de Controle de Qualidade

4.7.1 Intervalos de CIM

As Tabelas 4 e 5 apresentam os intervalos de precisão dos valores de CIM para um único teste de controle.^{6,7,12} Em geral, 1 dentre 20 valores de CIM, em série de 20 testes consecutivos, pode estar fora do controle (i.e., fora da faixa definida), devido às variações aleatórias do teste. Dois resultados consecutivos, com valores fora do esperado ou mais de 2 resultados fora do esperado em 20 testes de controle consecutivos, exigem medidas corretivas. Toda vez que se tomar medidas corretivas, a contagem de 20 testes consecutivos recomeça.

OBSERVAÇÃO: Não confundir este procedimento com o procedimento para estabelecer o desempenho satisfatório dos testes de CIM visando à realização de testes de controle de qualidade semanais, ao invés de diários (ver a Seção 4.7.2).

4.7.2 Freqüência dos Testes

Para monitorar o desempenho geral dos procedimentos para testes, recomenda-se incluir cepas de referência apropriadas, todo dia que o teste for realizado. Entretanto, a freqüência do monitoramento dos testes pode ser diminuída se o laboratório puder documentar desempenho satisfatório com testes de controle diários. Para esse fim, define-se desempenho satisfatório da seguinte maneira:

- (1) Documentação mostrando que todas as cepas de referência foram testadas durante 30 dias consecutivos de testes.
- (2) Para cada combinação droga-microorganismo, apenas 3 dentre 30 valores de CIM (i.e., valores de CIM obtidos para uma combinação droga-microorganismo durante 30 dias consecutivos de testes) podem estar fora do intervalo de acurácia definidos nas Tabelas 4 e 5.

OBSERVAÇÃO: Este procedimento é apenas para estabelecer o desempenho satisfatório dos testes de CIM, com a finalidade de realizar testes de controle de qualidade semanais, ao invés de diários. Este procedimento não deve ser confundido com os passos que devem ser seguidos para tomar as medidas de correção definidas na Seção 4.7.1.

Quando essas condições forem cumpridas, será preciso testar cada cepa de referência pelo menos uma vez por semana e sempre que qualquer reagente for mudado. Sempre que for constatado um valor de CIM fora do intervalo de acurácia, usando o sistema de monitoramento semanal, será necessário recomeçar e manter os testes de controle diários enquanto não se definir qual é a fonte de erro para o resultado aberrante e a resolução do problema não tiver sido documentada da seguinte maneira:

Realizar os testes com cepas de referência apropriadas durante cinco dias consecutivos. Para cada combinação droga-microorganismo, os cinco valores de CIM (ex., valores de CIM obtidos para uma combinação droga-microorganismo durante cinco dias consecutivos de testes) devem se manter dentro do intervalo de acurácia definidos nas Tabelas 4 e 5.

- (3) Se a solução do problema não puder ser documentada (ex., pelo menos um dos cinco valores de CIM estiver fora do intervalo de acurácia) será necessário continuar os testes diários de controle de qualidade. A volta aos testes semanais, no futuro, exigirá desempenho satisfatório documentado durante 30 dias consecutivos adicionais de testes, conforme delineado nesta seção.

No caso de algumas drogas, os testes de controle de qualidade devem ser efetuados com frequência maior do que uma vez por semana, devido à degradação relativamente rápida da droga.

4.8 Outros Testes de Controle

4.8.1 Controle do Crescimento

Cada série de testes de macrodiluição deve incluir um controle de crescimento do meio RPMI 1640, sem agente antifúngico, para avaliar a viabilidade dos organismos de teste. Com os testes de caldo, o controle do crescimento também serve como controle da turbidez para a leitura dos pontos finais.

4.8.2 Controle de Pureza

Uma amostra de cada inóculo deve ser colocada numa placa de ágar apropriado e incubada até haver suficiente crescimento visível para detectar culturas mistas e fornecer colônias isoladas frescas, para o caso de se tornar necessário fazer uma retestagem.

4.8.3 Controle da Leitura dos Pontos Finais da Reação

A leitura dos pontos finais da reação deve ser monitorada, periodicamente, para minimizar possíveis variações nos testes de CIM entre diferentes observadores. Todo pessoal de laboratório que realiza esses testes deverá ler, separadamente, um conjunto selecionado de testes de diluição. Os resultados devem ser registrados e comparados com os resultados obtidos por um técnico experiente. As cepas de referência com valores de CIM pré-determinados são particularmente úteis para esta finalidade, especialmente em testes com fluconazol.^{6,7,12}

4.9 Cepas de Controle de Qualidade (ver também a Seção 4.3)

As cepas de referência ideais para o controle de qualidade dos testes de diluição têm valores de CIM próximos ao ponto médio do intervalo de concentrações utilizado para todos os agentes antifúngicos; ex., uma cepa-controle ideal será inibida na quarta diluição de uma série de sete diluições, embora, cepas com valores de CIM na terceira ou na quinta diluição também sejam aceitáveis.

As Tabelas 4 e 5 relacionam os intervalos previstos para as cepas consideradas aceitáveis como cepas-controle de qualidade. Além disso, são apresentadas cepas adicionais que podem ser úteis para realizar estudos de referência.^{6,7,12}

- I Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:314-319.
- II Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, et al. Multicenter evaluation of proposed standardization procedure for antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 1997;35:139-143.
- III Anhalt JP, Washington JA II. Preparation and storage of antimicrobial solutions. In: Balows A, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1991:1199-1200.
- IV Espinel-Ingroff A, Steele-Moore L, Bruzzese VG, et al. Evaluation of two growth control dilutions for the determination of 90% (MIC-90%) and 80% (MIC-80%) inhibition fluconazole MIC end points. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;20:81-86.
- V Rex JH, Cooper CR Jr, Mertz WG, et al. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* species in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:906-909.
- VI Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards macrodiluição em broth method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2520-2522.
- VII Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 when used for susceptibility testing of *Candida* isolates to amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 1997;35:270-272.
- VIII Witt MD, Lewis RJ, Larsen RA, et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: The role of antifungal susceptibility testing. *Clin Infect Dis.* 1996;22:322-328.
- IX Pfaller MA, Buschelman B, Bale MJ, et al. Multicenter comparison of a colorimetric microdilution broth method with the reference macrodilution method for *in vitro* susceptibility testing of yeast isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;19:9-13.
- X Pfaller MA, Grant C, Morthland V, et al. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:506-509.
- XI Sewell DL, Pfaller MA, Barry AL, et al. Comparison of macrodiluição em broth, microdiluição em broth, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2099-2102.
- XII Pfaller MA, Messer SA, Coffman S, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC end point determinations using methods de microdiluição em broth to test five antifungal agents including the new triazole D0870. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1094-1097.
- XIII Anaissie E, Paetznick V, Bodey GP. Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*: Microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:1641-1646.

- XIV Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, et al. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:40-44.
- XV Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2081-2085.
- XVI Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing *in vitro* and therapeutic outcome *in vivo* for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:129-134.
- XVII Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH-dependent. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1383-1386.
- XVIII Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, et al. Interpretation of trailing end points in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standard method. *J Clin Microbiol.* 1998;36:153-156.
- XIX Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70 °C. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1000-1004.

Referências Bibliográficas

- ¹ Pfaller MA, Buschelman B, Bale MJ, et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol.* 1988;26:1437-1441.
- ² Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:1648-1654.
- ³ 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.
- ⁴ Espinel-Ingroff A, Kish CW Jr, Kerkering TM, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol.* 1992;30:3138-3145.
- ⁵ 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, fluconazol, and flucytosine. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1104-1107.
- ⁶ Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazol and itraconazol. *J Clin Microbiol.* 1996;34:816-817.
- ⁷ Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Rinaldi MG. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for *in vitro* antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standard. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:2494-2500.
- ⁸ Espinel-Ingroff A, Kerkering TM, Goldson PR, et al. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1089-1094.
- ⁹ Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1995.
- ¹⁰ Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* data for fluconazol, itraconazol, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis.* 1997;24:235-247.
- ¹¹ Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3457-3459.

Apêndice A. Meio RPMI-1640

RPMI-1640 meio tamponado com MOPS 0,165 mol/L, 1 L.

10,4g de meio RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato) 34,53g de tampão de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico)

Dissolver o meio em pó em 900mL de H₂O destilada. Acrescentar MOPS (concentração final de 0,165 mol/L), agitando até dissolver. Enquanto mexer, ajuste o pH para 7,0 a 25° C usando hidróxido de sódio 1 mol/L. Acrescentar água adicional para levar o meio a um volume final volume de 1 L. Esterilizar por filtração e armazenar a 4° C até usar.

Apêndice B. Padrão de Turbidez de Sulfato de Bário McFarland 0,5

Para padronizar a densidade do inóculo, utiliza-se uma solução padrão de turbidez de BaSO₄ (Solução Padrão de McFarland 0,5).

O processo consiste nos seguintes passos.

- (1) Preparar a solução padrão de turbidez acrescentando 0,5mL de BaCl₂ 0,048 mol/L (1,175% w/v BaCl₂•2H₂O) a 99,5mL de H₂SO₄ 0,18 mol/L (0,36 N) (1% v/v).
- (2) Verificar a densidade correta da solução padrão de turbidez usando um espectrofotômetro com via de luz (*light path*) de 1cm e cubeta correspondente para determinar a absorvância. A 625nm, a absorvância deverá ser de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland 0.5.
- (3) Colocar de 4 a 6mL em tubos com tampas de rosca, do mesmo tamanho dos usados para cultivar ou diluir o inóculo em cultura de caldo.
- (4) Fechar bem os tubos e armazená-los em câmara escura, a temperatura ambiente.
- (5) Agitar vigorosamente esse padrão de turbidez num misturador de vórtex mecânico imediatamente antes de usar.
- (6) Substituir as soluções padrão ou verificar novamente as densidades três meses depois de preparadas.

Apêndice C. Diretrizes de Interpretação dos Testes de Sensibilidade *In Vitro* das Espécies de *Candida*

Agente Antifúngico	Suscetível (S)	Sensibilidade Dose-Dependente (S-DD) [‡]	Sensibilidade Intermediária (I) [§]	Resistente (R)
Fluconazol*	≤ 8	16-32	-	≥ 64
Itraconazol [†]	≤ 0.125	0.25-0.5	-	≥ 1
Flucitosina	≤ 4	-	8-16	≥ 32

O quadro apresenta os pontos de corte (µg/mL) contra os agentes indicados para as espécies de *Candida*. Quando as CIMs são mensuradas usando uma escala que produz resultados entre uma e outra categoria, a sensibilidade do isolado será classificada na categoria imediatamente superior. Assim, um isolado com uma CIM de fluconazol de 12,5µg/mL seria colocado na categoria S-DD.[¶]

Notas de Rodapé

- * Para fluconazol, estas diretrizes baseiam-se, substancialmente, em experiência com infecções de mucosa, mas são consistentes com as informações limitadas existentes sobre infecções invasivas por *Candida* spp. Acredita-se que os isolados de *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol, e que suas CIMs não devem ser interpretadas usando esta escala. Também é pertinente que o limite superior de 8µg/mL para a faixa suscetível a fluconazol não é conhecido com certeza—os dados permitiriam a seleção de 4 ou 8µg/mL para esse ponto de corte.
- † Para itraconazol, os dados baseiam-se, totalmente, em experiência com infecções de mucosa, e não há dados disponíveis que suportem os pontos de corte para as infecções invasivas por *Candida* spp.
- ‡ A sensibilidade depende de se atingir o nível sanguíneo máximo possível. Para fluconazol, podem ser necessárias doses de 400mg/dia, ou mais, para adultos com função renal e características físicas normais. Para itraconazol, podem ser necessárias medidas para garantir a absorção adequada da droga, podendo ser necessário alcançar concentrações plasmáticas de itraconazol de >0,5µg/mL para se obter uma resposta ótima.
- § Não há certeza quanto à sensibilidade destes isolados, sendo que os dados disponíveis não permitem sua classificação seja como “sensíveis” seja como “resistentes”.

[¶] Esses pontos de corte foram adotados numa reunião do subcomitê realizada em 1º de junho de 1996, em Reston, VA. Esses pontos de corte são considerados tentativos durante um ano e estão abertos a comentários.

Tabela 1. Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antifúngicos

Agente Antifúngico	Solvente (Soluções com Concentração Máxima e Intermediária)	Diluyente (Concentrações Finais)
Anfotericina B	DMSO*	Meio
Cetoconazol	DMSO*	Meio
Itraconazol	DMSO*	Meio
Posaconazol	DMSO*	Meio
Ravuconazol	DMSO*	Meio
Voriconazol	DMSO*	Meio
Fluconazol	Água	Meio
Flucitosina	Água	Meio

Estes produtos são potencialmente tóxicos. Antes de usar quaisquer destes materiais, deve-se consultar as folhas de dados de segurança dos materiais (MSDS), que o fabricante do produto disponibiliza.

*Dimetilsulfóxido

Tabela 2. Esquema de Preparação de Diluições de Agentes Antifúngicos Solúveis em Água para Uso em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo

Solução Antimicrobiana										
Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	+	Meio (mL)	=	Concentração Intermediária (µg/mL)	=	Concentração Final de 1:10 (µg/mL)	Log ₂
1	5120	Padrão	1 mL		7		640 µg/mL		64	6
2	640	Passo 1	1,0		1,0		320		32	5
3	640	Passo 1	1,0		3,0		160		16	4
4	160	Passo 3	1,0		1,0		80		8	3
5	160	Passo 3	0,5		1,5		40		4	2
6	160	Passo 3	0,5		3,5		20		2	1
7	20	Passo 6	1,0		1,0		10		1	0
8	20	Passo 6	0,5		1,5		5		0,5	-1
9	20	Passo 6	0,5		3,5		2,5		0,25	-2
10	2,5	Passo 9	1,0		1,0		1,25		0,125	-3
11	2,5	Passo 9	0,5		1,5		0,625		0,0625	-4
12	2,5	Passo 9	0,5		3,5		0,3125		0,03125	-5

Tabela 3. Esquema de Preparação de Séries de Diluições de Agentes Antifúngicos Insolúveis em Água para Uso em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo

Solução Antimicrobiana										
Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	+	Meio (mL)	=	Concentração Intermediária (µg/mL)*	=	Concentração Final de 1:100 (µg/mL)†	Log ₂
1	1,600	Padrão					1.600		16	4
2	1,600	Padrão	0,5		0,5		800		8,0	3
3	1,600	Padrão	0,5		1,5		400		4,0	2
4	1,600	Padrão	0,5		3,5		200		2,0	1
5	200	Passo 4	0,5		0,5		100		1,0	0
6	200	Passo 4	0,5		1,5		50		0,5	-1
7	200	Passo 4	0,5		3,5		25		0,25	-2
8	25	Passo 7	0,5		0,5		12,5		0,125	-3
9	25	Passo 7	0,5		1,5		6,25		0,0625	-4
10	25	Passo 7	0,5		3,5		3,13		0,0313	-5

* Dimetilsulfóxido

† Concentração 2x

Tabela 4. Limites Recomendados para CIMs de 48 Horas para Duas Cepas de Controle de Qualidade e Quatro Cepas de Referência para Testes de Diluição em Caldo. (De Pfaller MA, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazol, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995;33:1104-1107; and Rex JH, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazol and itraconazol. *J Clin Microbiol* 1996;34:816-817.)

Organismo	Propósito	Agente Antifúngico	Faixa de CIM* (µg/mL)	% das CIMs dentro da Faixa
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	CQ	Anfotericina B	0,25-1,0	99,1
		Fluconazol	2,0-8,0	99,1
		Itraconazol	0,06-0,25	99,0
		Cetoconazol	0,06-0,25	99,0
		5FC	0,12-0,5	98,6
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	CQ	Anfotericina B	0,25-2,0	99,5
		Fluconazol	16-64	99,1
		Itraconazol	0,12-0,5	94,0
		Cetoconazol	0,12-0,5	100,0
		5FC	4,0-16	96,8
<i>Candida albicans</i> ATCC® 90028	Referência	Anfotericina B	0,5-2,0	91,9
		Fluconazol	0,25-1,0	97,3
		5FC	0,5-2,0	95,0
<i>Candida albicans</i> ATCC® 24433	Referência	Anfotericina B	0,25-1,0	99,5
		Fluconazol	0,25-1,0	95,9
		5FC	1,0-4,0	91,9
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 90018	Referência	Anfotericina B	0,5-2,0	96,4
		Fluconazol	0,25-1,0	98,2
		5FC	≤0,12-0,25	99,5
<i>Candida tropicalis</i> ATCC® 750	Referência	Anfotericina B	0,5-2,0	93,7
		Fluconazol	1,0-4,0	95,5
		5FC	≤0,12-0,25	99,5

OBSERVAÇÃO: ATCC® é marca registrada da American Type Culture Collection.

Tabela 5. Limites Recomendados para CIMs de 24 e 48 horas para Duas Cepas de Controle de Qualidade para Microdiluição em Caldo. (De Barry AL, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3457-3459. Usado mediante autorização da American Society for Microbiology and AL Barry.)

Faixas de CIM (µg/mL) para testes de microdiluição							
Organismo	Agente Antifúngico	Faixa	24 Horas	% dentro da Faixa	Faixa	48 Horas	% dentro da Faixa
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Anfotericina B	0,25-2,0	0,5	97	0,5-4,0	2,0	92
	5FC	0,06-0,25	0,12	99	0,12-0,5	0,25	98
	Fluconazol	0,5-4,0	2,0	98	1,0-4,0	2,0	99
	Itraconazol	0,12-0,5	0,25	96	0,12-0,5	0,25	98
	Cetoconazol	0,03-0,25	0,06/0,12	98	0,06-0,5	0,12	98
	Voriconazol	0,016-0,12	0,06	100	0,03-0,25	0,06	100
	Ravuconazol	0,016-0,12	0,06	96	0,03-0,25	0,06	98
	Posaconazol	0,06-0,25	0,12	97	0,06-0,25	0,12	99
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Anfotericina B	0,5-2,0	1,0	100	1,0-4,0	2,0	100
	5FC	4,0-16	8,0	98	8,0-32	16	99
	Fluconazol	8,0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazol	0,12-1,0	0,5	96	0,25-1,0	0,5	100
	Cetoconazol	0,12-1,0	0,5	96	0,25-1,0	0,5	99
	Voriconazol	0,06-0,5	0,25	98	0,25-1,0	0,5	100
	Ravuconazol	0,06-0,5	0,25	93	0,25-2,0	0,5	100
	Posaconazol	0,06-0,5	0,25	100	0,12-1,0	0,5	99

OBSERVAÇÃO: ATCC® é marca registrada da American Type Culture Collection.

Tabela 6. Composição do Meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho fenol, mas sem bicarbonato)

Constituinte	g/L de Água	Constituinte	g/L de Água
L-arginina (base livre)	0,200	Biotina	0,0002
L-aspargina (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-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B ₁₂	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	Glutationa, reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883	Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

Tabela 7. Modificações para Circunstâncias Especiais *

Droga	Organismo	Modificação	Referência
Anfotericina B	<i>Candida</i> spp	O uso do Meio Antibiótico pode auxiliar na detecção de resistência, mas esse meio não está padronizado, sendo possível variabilidade substancial entre lotes.	Ver a Seção 3.7.1 †,‡
Todas as drogas	<i>C. neoformans</i>	O uso de Base Levedura Nitrogênio pode destacar o crescimento de <i>C. neoformans</i> e melhorar a relevância clínica das CIMs dos agentes antifúngicos.	§, ¶
Todas as drogas	Todos os organismos	A suplementação do meio de teste para que contenha uma concentração final de glicose de 20g/L pode simplificar a determinação do ponto final.	#

- Essas modificações não fazem parte da metodologia formal da Norma M27-A e a utilidade de cada modificação ainda não foi estabelecida. Esta tabela é fornecida apenas como referência para os laboratórios interessados em estudar adaptações da Norma M27-A que possa aumentar sua utilidade em circunstâncias especiais.

† Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 when used for susceptibility testing of *Candida* isolates to amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 1997;35:270-272.

‡ Pfaller MA, Buschelman B, Bale MJ, et al. Multicenter comparison of a colorimetric microdilution broth method with the reference macrodilution method for *in vitro* susceptibility testing of yeast isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;19:9-13.

§ Pfaller MA, Grant C, Morthland V, et al. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazol against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:506-509.

¶ Ghannoum MA, Ibrahim AS, Fu Y, Shafiq MC, Edwards JE, Criddle RS. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a microdilution technique. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2881-2886.

Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazol susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:45-48.

Os procedimentos consensuais do NCCLS incluem o processo de recurso descrito, detalhadamente, na Seção 9 dos Procedimentos Administrativos. Para mais informações, favor contactar os Escritórios Executivos ou visitar nosso website em www.nccls.org.

Resumo dos Comentários e Respostas do Subcomitê

M27-A: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard*

Geral

1. Em relação às páginas 6, 7 e 8, a suspensão-padrão de inóculo de levedura em solução salina é diluída 1:100 e 1:20 ou 1:50 e 1:20 em caldo RPMI 1640, para a macrodiluição e microdiluição, respectivamente. Alternativamente seria mais conveniente, ex., 1:100 ou 1:50 ao invés de caldo RPMI 1640. Nossa comparação não mostra diferença nos valores de CIM usando quaisquer das duas diluições.
 - **Concordamos. Não há razão para mudar os testes.**
2. Em algumas normas do NCCLS, como as normas M7 e M27, há tabelas mostrando como dissolver os diferentes agentes antimicrobianos. Parte do material que está sendo usado como solvente (metanol, DMSO, etanol) pode ser perigoso. O DMSO, por exemplo, é considerado um alergênio, uma substância irritante e, quando aquecido, emite vapores tóxicos. E, o que é mais importante, é um produto que é absorvido pela pele, levando consigo qualquer substância nele dissolvida (1). Esses documentos têm uma declaração relativa as “Precauções Universais”, mas não uma declaração sobre segurança química. Sugiro que se inclua uma declaração sobre segurança química nesses documentos. Essa declaração, de preferência, deveria ser incluída na seção em que se recomenda o uso do material.
 - **A declaração foi acrescentada como nota de rodapé na Tabela 1.**

Resumo dos Comentários dos Delegados e Respostas do Subcomitê

M27-A2: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition*

Geral

1. As instruções sobre a determinação dos valores de CIM de fluconazol, itraconazol e 5FC são ambíguas. Em um trecho sugere-se que se faça uma diluição para preparar solução semelhante à inibição = 80%, usando o controle de crescimento e, em outro lugar, se diz que a CIM = poço com a queda mais acentuada ou diminuição de crescimento. Na nossa experiência a determinação da CIM como = ao poço com a queda mais acentuada é muito mais reprodutível (tanto internamente quando entre observadores externos).
- **Existem diferenças na determinação dos pontos finais para esses agentes quando testados pelos métodos de macrodiluição *versus* microdiluição. O método de macrodiluição pode ser lido como o primeiro tubo de ensaio no qual se vê uma inibição de 80% em relação ao crescimento no tubo de controle. Não é possível diferenciar entre inibição de 50% e 80% a "olho nu" quando se usa o método de microdiluição e, por isso, a redação alternativa de "diminuição acentuada...". Essas distinções são explicadas no documento. A leitura da CIM na microdiluição para os azólicos e 5FC é difícil e, após muita discussão e investigação, o subcomitê chegou à descrição de que a melhor aproximação ao ponto final é por meio de diminuição "acentuada ou óbvia" do crescimento. Também declaramos que essa leitura visual é próxima do que se encontra usando uma leitura espectrofotométrica de inibição de 50%. Essas definições já foram bem descritas na literatura, incluindo numerosas publicações do subcomitê.**

Seção 2.2

2. Parece-me estranha essa cifra exata de 182,6mg, a serem retirados além do necessário. Por que não arredondar para 182 ou 180?
- **Esse é apenas um exemplo e assim foi declarado.**

Seção 2.3.2

3. Quando se usa filtragem, seria apropriado indicar qual meio e diluente podem ser usados, com base nas drogas.
- **O subcomitê não frisou a filtragem, mas, quando usada, não se exclui qualquer meio, especialmente RPMI, uma vez que é o "padrão"**

Seções 3.7.3 e 3.7.5

4. A falta de correlação clínica está bem colocada. Entretanto, pode haver uma indicação implícita de que os testes de sensibilidade deveriam ser realizados para candidíases orais. Não tenho certeza com que frequência seria recomendável.
- **O subcomitê teve muito cuidado ao descrever as correlações clínicas, bem como os casos em que os testes podem ser proveitosos. O subcomitê acredita que os testes de isolados orais podem ser úteis em casos que envolvam resposta subótima à terapia.**

Seção 3.8

5. Os poços nas fileiras de 1 a 10 contêm diluições de drogas. Os poços na fileira 11 são usados para os controles de crescimento. Os poços na fileira 12 (não 11) podem ser usados como controles estéreis. E os controles de DMSO?
 - **O esquema de diluição descrito assegura que haverá menos de 1% de DMSO em quaisquer dos poços e, portanto, o DMSO não afetará o crescimento.**
6. “Diminuição proeminente na turbidez” parece arbitrária. Existe alguma maneira eletrônica para medir?
 - **Foi colocado que uma diminuição “proeminente” na turbidez determinada visualmente estará correlacionada com uma redução de 50% na turbidez determinada por espectrofotômetro.**

Seção 4.8.3

7. Em relação à "interpretação do ponto final," há fotografias disponíveis que mostrem as várias pontuações de inibição, de maneira a minimizar as diferenças de interpretação entre os observadores? Que tal um programa em CD-ROM?
 - **O subcomitê considerou essa possibilidade, mas decidiu não incluir fotografias na presente edição. Existe um certo número de agentes novos para os quais essas fotografias poderiam ser necessárias; esses serão considerados para inclusão em edições posteriores.**

Publicações Afins do NCCLS*

- M2-A7 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Seventh Edition (2000).** Esta norma revisada contém uma atualização das técnicas, dos critérios interpretativos e dos parâmetros de controle de qualidade recomendados para os testes de sensibilidade por disco.
- M7-A5 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Fifth Edition (2000).** Esta norma revisada contém uma atualização dos métodos usados para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra bactérias aeróbicas mediante macrodiluição , microdiluição e diluição em ágar.
- M11-A5 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Fifth Edition (2001).** Fornece métodos de referência para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra bactérias anaeróbicas mediante macrodiluição , microdiluição e diluição em ágar.
- M23-A2 Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Discute os dados necessários e recomendados para a seleção de padrões de interpretação e diretrizes de controle de qualidade apropriado para os novos agentes antimicrobianos.
- M24-T2 Antimycobacterial Susceptibility Testing; Tentative Standard—Second Edition (2000).** Este documento contém recomendações relativas aos meios de cultura mais comuns e à padronização das concentrações de drogas, assim como um método para padronizar as diluições de inóculo e pontos finais claramente definidos para os testes de sensibilidade de organismos similares a tuberculose.
- M29-A2 Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Este documento fornece orientação relativa aos riscos de transmissão dos vírus da hepatite e vírus da imunodeficiência humana em qualquer contexto laboratorial e às precauções específicas para prevenir a transmissão laboratorial de infecções transmitidas pelo sangue por instrumentos e materiais de laboratório; bem como recomendações sobre a conduta em casos de exposição a microorganismos transmitidos pelo sangue.
- M38-A Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard (2002).** Este documento trata da seleção de agentes antifúngicos; preparação de soluções padrão e diluições de agentes antifúngicos para os testes; implementação e interpretação dos testes; e dos requisitos de controle de qualidade para os testes de sensibilidade dos fungos filamentosos (bolores) que causam infecções fúngicas invasivas.

* Documentos propostos e tentativos estão sendo apresentados através do processo consensual do NCCLS; portanto, os leitores deverão se reportar às edições mais recentes.

ANOTAÇÕES

NCCLS ▼ 940 West Valley Road ▼ Suite 1400 ▼ Wayne, PA 19087 ▼ USA ▼ FONE 610.688.0100
FAX 610.688.0700 ▼ E-MAIL: exoffice@nccls.org ▼ WEBSITE: www.nccls.org ▼ ISBN 1-56238-469-4

