
Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada

Este documento apresenta a seleção de agentes antifúngicos; preparação de soluções antifúngicas padrão e diluições para a realização, implementação e interpretação de testes; e os requisitos de controle de qualidade para testes de sensibilidade de fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas. 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 M38-A 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 M38-A 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:

Silvia Figueiredo Costa-Doutora em Medicina pelo Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade de São Paulo.

Organização Pan Americana de Saúde

Revisores:

Arnaldo Colombo

Professor Titular da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, Chefe do Laboratório Especial de Micologia.

Marcio Nucci

Prof. Adjunto, Depto Clínica Médica, Chefe do Lab Micologia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ

Maria José Soares Mendes-Giannini

Professora Adjunta da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Araraquara.

Marcia S. C. Melhem

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

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 promove 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 os critérios para as práticas e os procedimentos, ou os materiais operacionais gerais a serem usados de maneira voluntária. Uma diretriz pode ser usada conforme redigida, ou modificada pelo usuário para conformá-la a 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; e 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 tentativa é 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 se avaliar a utilidade do documento final, garantir que se chegue a um consenso (ex., que os comentários relativos a versões anteriores foram satisfatoriamente resolvidos) e identificar qualquer necessidade de documentos consensuais adicionais.

As normas/padrões e diretrizes do NCCLS representam uma opinião consensual sobre as boas práticas e refletem um acordo substancial por parte de partes interessadas, competentes e afetadas 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 regulamentos pertinentes. Conseqüentemente, o acatamento 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 resultam em mudança no documento quando publicado no próximo nível consensual, bem como aqueles que não resultam em mudança, são respondidos pelo comitê num 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 contactar os Escritórios Executivos do NCCLS.

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada

Resumo

A Norma M38-A--Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada do NCCLS descreve um método para testar a sensibilidade dos fungos filamentosos que causam infecções invasivas, incluindo espécies de *Aspergillus*, espécies de *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*, assim como outros fungos patogênicos oportunistas, aos agentes antifúngicos. O documento inclui a seleção dos agentes antifúngicos; a preparação de soluções padrão e diluições de antifúngicos usadas na realização, implementação e interpretação dos testes; e o propósito e a implementação dos testes de controle de qualidade. Apresenta também um exame cuidadoso das responsabilidades de controle de qualidade dos fabricantes e dos usuários.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 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 listadas no Catálogo do NCCLS, distribuído às organizações membros e, aos não-membros mediante solicitação. 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

ISBN 1-56238-470-8

ISSN 0273-3099

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a
Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada

Volume 22 Número 16

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, num único local; para empréstimo entre bibliotecas; ou para uso em programas educacionais, sempre que as várias cópias dessa reprodução forem distribuídas gratuitamente, não contenham, em qualquer circunstância, mais do que 20% do texto do documento e inclua o seguinte aviso,

Reproduzido mediante autorização, parte da publicação do NCCLS M38-A--Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada (ISBN 1-56238-470-8). 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 Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.)

Norma Proposta – Novembro de 1998

Norma aprovada – Agosto de 2002

ISBN 1-56238-470-8 ISSN 0273-3099

Membros do Comitê

Comitê da Área de Microbiologia

James H. Jorgensen, Ph.D.
Presidente

University of Texas Health Science 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 Terapia Antifúngica

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

Assessores

Arthur L. Barry, Ph.D.

Clinical Microbiology Institute
Wilsonville, Oregon

Lois M. Schmidt, D.A.

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Oficiais de Ligação

Tracy Ann Dooley, M.L.T. (ASCP)
Gerente do Projeto

NCCLS
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 Mantedoos

Abbott Laboratórios
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)
Asociacion Mexicana de
Bioquímica Clínica A.C.
Assn. of Public Health Laboratórios
Assoc. Micro. Clmici Italiani-
A.M.C.L.I.
British Society for Antimicrobial
Chemoutroapy
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
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
Laboratórios
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 Laboratórios
Department of Veterans Affairs
Deutsches Institut fir 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 Laboratórios
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 Laboratórios
Abbott Laboratórios, 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
BD Consumer Products
BD Diagnostic Systems
BD Italia S.P.A.
BD VACUTAINER Systems
Beckman Coulter, Inc.
Beckman Coulter, Inc. Primary Care
Diagnostics
Beckman Coulter K.K. (Japan)
Bio-Development SRL
Bio-Inova Life Sciences
International
Bio-Inova Life Sciences North
America
BioMedia Laboratórios Sdn Bhd
BioMérieux (NC)
bioMérieux, Inc. (MO)
Biometrology Consultants
Bio-Rad Laboratórios, Inc.
Bio-Rad Laboratórios, Inc. - France
Biotest AG
Blaine Healthcare Associates, Inc.
Bristol-Myers Squibb Company
Canadian External Quality
Assessment Laboratory
Capital Management Consulting,
Inc.
Carl Schaper
Checkpoint Development Inc.
Chiron Corporation
ChromaVision Medical Systems,
Inc.

Chronolab Ag
 Clinical Design Group Inc.
 Clinical Laboratory Improvement
 Consultants
 Cognigen
 Community Medical Center (NJ)
 Controle Lab (Brazil)
 Copan Diagnostics Inc.
 Cosmetic Ingredient Review
 Cubist Pharmaceuticals
 Dade Behring Inc. - Deerfield, IL
 Dade Behring Inc. - Glasgow, DE
 Dade Behring Inc. - Marburg,
 Germany
 Dade Behring Inc. - Sacramento, CA
 Dade Behring Inc. - San Jose, CA
 David G. Rhoads Associates, Inc.
 Diagnostics Consultancy
 Diagnostic Products Corporation
 Eiken Chemical Company, Ltd.
 Elan Pharmaceuticals
 Electa Lab s.r.l.
 Enterprise Analysis Corporation
 Essential Therapeutics, Inc.
 EXPERTech Associates, Inc.
 F. Hoffman-La Roche AG
 Fort Dodge Animal Health
 General Hospital Vienna (Austria)
 Gen-Probe
 GlaxoSmithKline
 Greiner Bio-One Inc.
 Helena Laboratórios
 Home Diagnostics, Inc.
 Immunicon Corporation
 Instrumentation Laboratory
 International Technidyne
 Corporation
 IntraBiotics Pharmaceuticals, Inc.
 I-STAT Corporation
 Johnson and Johnson Pharmaceutical
 Research and Development,
 L.L.C.
 Kendall Sherwood-Davis & Geck
 LAB-Interlink, Inc.
 Laboratory Specialists, Inc.
 Labtest Diagnostica S.A.
 LifeScan, Inc. (a Johnson &
 Johnson Company)
 Lilly Research Laboratórios
 Maceon Consultants
 Medical Device Consultants, Inc.
 Merck & Company, Inc.
 Minigrip/Zip-Pak
 Molecular Diagnostics, Inc.
 mvi Sciences (MA)
 Nabi
 Nichols Institute Diagnostics
 (Div. of Quest Diagnostics, Inc.)
 NimbleGen Systems, Inc.
 Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.
 Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.
 Norfolk Associates, Inc.
 Novartis Pharmaceuticals
 Corporation
 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
 (Raritan, NJ)
 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
 (Rochester, NY)
 Oxoid Inc.
 Paratek Pharmaceuticals

Pfizer Inc
 Pharmacia Corporation
 Philips Medical Systems
 Powers Consulting Services
 Premier Inc.
 Procter & Gamble
 Pharmaceuticals, Inc.
 The Product Development Group
 ESQ Consulting
 Quintiles, Inc.
 Radiometer America, Inc.
 Radiometer Medical A/S
 Roche Diagnostics GmbH
 Roche Diagnostics, Inc.
 Roche Laboratórios (Div.
 Hoffmann-La Roche Inc.)
 Sarstedt, Inc.
 SARL Laboratoire Carron (France)
 Schering Corporation
 Schleicher & Schuell, Inc.
 Second Opinion
 Showa Yakuhin Kako Company,
 Ltd.
 Streck Laboratórios, Inc.
 SurroMed, Inc.
 Synermed Diagnostic Corp.
 Sysmex Corporation (Japan)
 Sysmex Corporation - Long Grove,
 IL
 The Clinical Microbiology Institute
 The Toledo Hospital (OH)
 Theravance Inc.
 Transasia Engineers
 Trek Diagnostic Systems, Inc.
 Versicor, Inc.
 Vetoquinol S.A.
 Visible Genetics, Inc.
 Vysis, Inc.
 Wallace Oy
 Wyeth-Ayerst
 Xyletech Systems, Inc.
 YD Consultant
 YD Diagnostics (Seoul, Korea)

Associações de Classe

AdvaMed
 Association of Medical
 Diagnostic Manufacturers
 Japan Association Clinical
 Reagents Ind. - Tokyo, Japan
 Medical Industry Association
 of Australia

Membros Associados Ativos

20th Medical Group (SC)
 31st Medical Group/SGSL (APO,
 AE)
 67th CSH Wuerzburg, GE (NY)
 121st General Hospital (CA)
 Academisch Ziekenhuis-VUB
 (Belgium)
 Acadiana Medical Laboratórios,
 LTD (LA)
 Adena Regional Medical Center
 (OH)
 Advocate Healthcare Lutheran
 General (IL)
 Akershus Central Hospital and AFA

(Norway)
 Albemarle Hospital (NC)
 Allegheny General Hospital (PA)
 Allegheny University of the
 Health Sciences (PA)
 Allina Health System (MN)
 Alton Ochsner Medical
 Foundation (LA)
 American Medical Laboratórios
 (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
 Laboratórios (WI)
 Azienda Ospedale Di Lecco (Italy)
 Bay Medical Center (MI)
 Baystate Medical Center (MA)
 Bbguas Duzen Laboratórios
 (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 della
 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)
 Clarian Health-Methodist Hospital
 (IN)
 Clendo Lab (Puerto Rico)
 Clinical Laboratory Partners, LLC
 (CT)
 CLSI Laboratórios (PA)
 Columbia Regional Hospital (MO)
 Commonwealth of Kentucky
 Community Hospital of Lancaster
 (PA)

CompuNet Clinical Laboratórios (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)
 Gateway Medical Center (TN)
 Geisinger Medical Center (PA)
 Grady Memorial Hospital (GA)
 Guthrie Clinic Laboratórios (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 Laboratórios (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)
 Klinicni Center (Slovenia)
 Laboratórios 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 Instituto 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 System
 North Carolina State Laboratory of Public Health
 North Kansas City Hospital (MO)
 North Shore - Long Island Jewish Health System Laboratórios (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 Laboratórios, 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 Laboratórios, Ltd. (GA)
 Regions Hospital
 Reid Hospital & Health Care
 Services (IN)
 Research Medical Center (MO)
 Rex Healthcare (NC)
 Rhode Island Department of Health
 Laboratórios
 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 Laboratórios, 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)

MEMBROS DA DIRETORIA

| | | |
|---|--|---|
| Donna M. Meyer, Ph.D., Presidente CHRISTUS Health | Susan Blonshine, RRT, RPFT, FAARC TechEd | Tadashi Kawai, M.D., Ph.D. International Clinical Pathology Center |
| Thomas L. Hearn, Ph.D., Presidente Eleito Centers for Disease Control and Prevention | Wayne Brinster BD | J. Passohen Kroger, M.D., MACP COLA |
| Emil Voelkert, Ph.D., Secretário Roche Diagnostics GmbH | Kurt H. Davis, FCSMLS, CAE Canadian Society for Medical Laboratory Science | Willie E. May, Ph.D National Institute of Standards and Technology |
| Gerald A. Hoeltge, M.D., Tesoureiro The Cleveland Clinic Foundation | Lillian J. Gill, M.S. FDA Center for Devices and Radiological Health | Gary L. Myers, Ph.D. Centers for Disease Control and Prevention |
| F. Alan Andersen, Ph.D., Presidente Imediatamente Anterior Cosmetic Ingredient Review | Robert L. Habig, Ph.D. Habig Consulting Group | Barbara G. Painter, Ph.D. Bayer Corporation (Aposentada) |
| John V. Bergen, Ph.D., Diretor Executivo | Carolyn D. Jones, J.D., M.P.H. AdvaMed | Judith A. Yost, M.A., M.T.(ASCP) Centers for Medicare & Medicaid Services |

Sumário

| | | |
|--|---|----|
| Resumo | i | |
| Membros do Comitê | v | |
| Membros Ativos | vii | |
| Prefácio | xv | |
| O Enfoque de Sistema de Qualidade | xvi | |
| 1 | Introdução | 1 |
| 1.1 | Escopo | 1 |
| 1.2 | Definições | 1 |
| 2 | Agentes Antifúngicos | 2 |
| 2.1 | Fonte | 2 |
| 2.2 | Pesagem de Pós Antifúngicos | 2 |
| 2.3 | Preparação de Soluções Padrão | 3 |
| 2.4 | Número de Concentrações Testadas | 4 |
| 2.5 | Seleção dos Agentes Antifúngicos para Testes e Relatórios de Rotina | 4 |
| 3 | Testes | 4 |
| 3.1 | Meio de Cultivo em Caldo | 4 |
| 3.2 | Preparação de Diluições de Agentes Antifúngicos | 5 |
| 3.3 | Preparação do Inóculo | 6 |
| 3.4 | Inoculação em Meio RPMI-1640 de | 6 |
| 3.5 | Incubação | 6 |
| 3.6 | Leitura de Resultados | 6 |
| 3.7 | Interpretação dos Resultados | 7 |
| 3.8 | Modificações na Metodologia de Macrodiluições em Caldo | 8 |
| 3.9 | Outras Modificações | 8 |
| 4 | Controle de Qualidade | 9 |
| 4.1 | Propósito | 9 |
| 4.2 | Responsabilidades de Controle de Qualidade | 9 |
| 4.3 | Seleção das Cepas de Referência | 10 |
| 4.4 | Armazenamento das Cepas de Referência | 10 |
| 4.5 | Uso Página: 13 | |
| | das Cepas de Referência na Rotina dos Ensaio | 11 |
| 4.6 | Controle dos Lotes de Meio e dos Lotes de Equipamento de Plástico | 12 |
| 4.7 | Frequência dos Testes de Controle de Qualidade | 12 |
| 4.8 | Outros Procedimentos de Controle | 13 |
| 4.9 | Cepas de Controle de Qualidade | 13 |
| Referências Bibliográficas | 14 | |
| Apêndice A. Meio RPMI-1640 | 16 | |
| Apêndice B. Padrão de Turbidez de Sulfato de Bário Escala 0.5 de McFarland | 16 | |

Sumário (Continuação)

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antifúngicos | |
| 17 | |
| Tabela 2. Esquema de Preparação de Séries de Diluições de Agentes Antifúngicos Insolúveis em Água para Uso em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo | 18 |
| Tabela 3. Esquema de Preparação de Diluições de Agentes Antifúngicos Solúveis em Água para Uso em to Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo | 19 |
| Tabela 4. Limites de CIM Recomendados para Duas Cepas de Referência e Controle de Qualidade para Testes de Diluição em Caldo | 20 |
| Tabela 5. Composição do Meio RPMI-1640 | 21 |
| Resumo dos Comentários e das Respostas do Subcomitê | 22 |
| Resumo dos Comentários dos Delegados e das Respostas do Subcomitê | 27 |
| Publicações Afins do NCCLS | 29 |

Prefácio

Com o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o número crescente de agentes antifúngicos, aumentou também o interesse em métodos laboratoriais para orientar a seleção de terapia antifúngica. O Comitê da Área de Microbiologia do NCCLS estabeleceu o Subcomitê para Testes de Sensibilidade a Agentes Antifúngicos, tendo sido coletado um grande acervo de dados sobre testes de leveduras, numa série de estudos colaborativos. Como resultado, o NCCLS publicou a Norma M27 *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*, estabelecendo as faixas de CIM e desenvolvendo os pontos de corte.

Com base nessas realizações, o subcomitê concluiu que seria útil trabalhar no desenvolvimento de testes de referência reprodutíveis para os testes de sensibilidade dos fungos filamentosos aos agentes antifúngicos. Um grupo de trabalho sobre fungos filamentosos foi criado com a missão de realizar estudos para coletar dados e refinar a metodologia dos testes de sensibilidade dessas espécies de fungos. Como resultado de dois estudos colaborativos, o subcomitê chegou a um acordo sobre as condições do teste, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, o período e a temperatura de incubação, a formulação do meio, assim como os critérios para a determinação da CIM.^{1,2} Um estudo adicional indicou algum grau de correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e a resposta ao tratamento em modelos animais.^{2,3}

Devido à adequação do meio sintético RPMI-1640 aos testes de sensibilidade das leveduras aos agentes antifúngicos, foi avaliado pelo subcomitê como possível meio de referência para fungos.^{1,2} O subcomitê avaliou outras formulações de meios, mas o meio RPMI padrão possibilitou a identificação, com maior grau de coerência, da resistência a itraconazol em *Aspergillus* spp., em oito laboratórios.⁴ Além disso, adotaram-se os métodos de preparação das soluções padrão das drogas e os testes de diluição desenvolvidos anteriormente para testes de antifúngicos contra leveduras (M27).

Precauções Padrão

Sendo impossível, com freqüência, saber o que é infeccioso, todos os espécimes de sangue, fluidos e tecidos humanos devem ser tratados como infecciosos 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 orientam sobre 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.

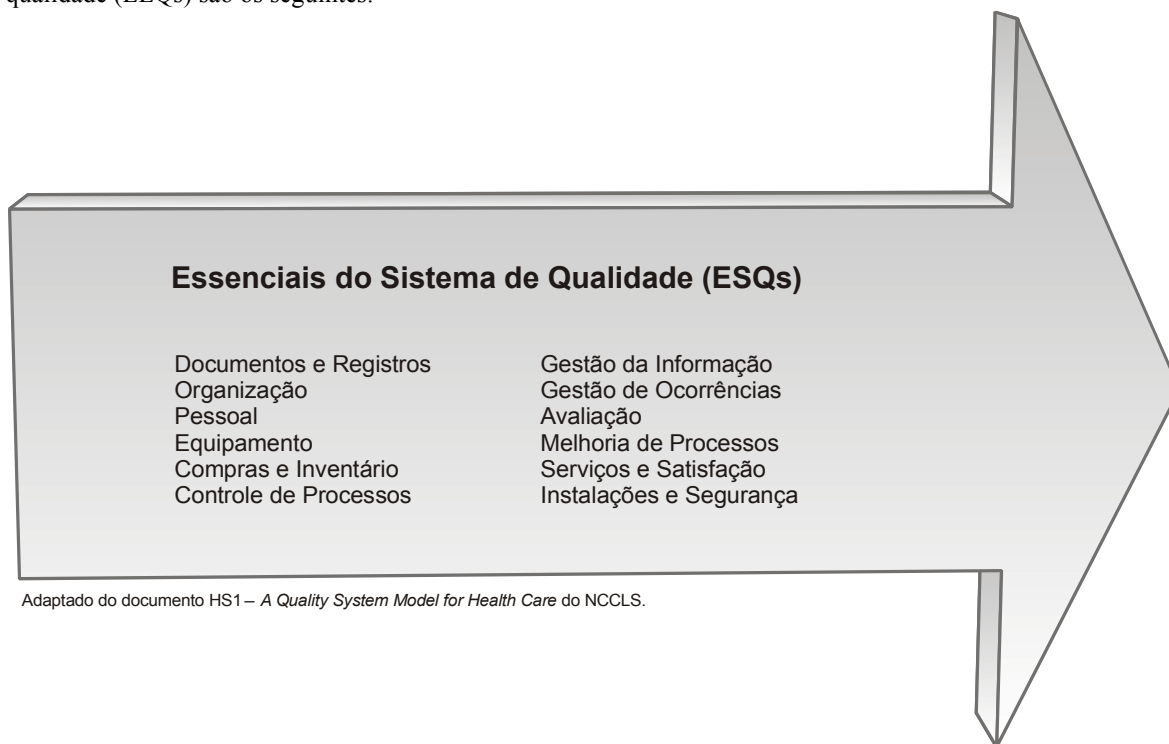
Palavras-Chave

Antifúngico, microdiluição em caldo, fungos filamentosos, testes de sensibilidade.

Enfoque de Sistema de Qualidade

O NCCLS endossa o enfoque de sistema de qualidade para o desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes, visto que isto 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 via, de qualquer 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.



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

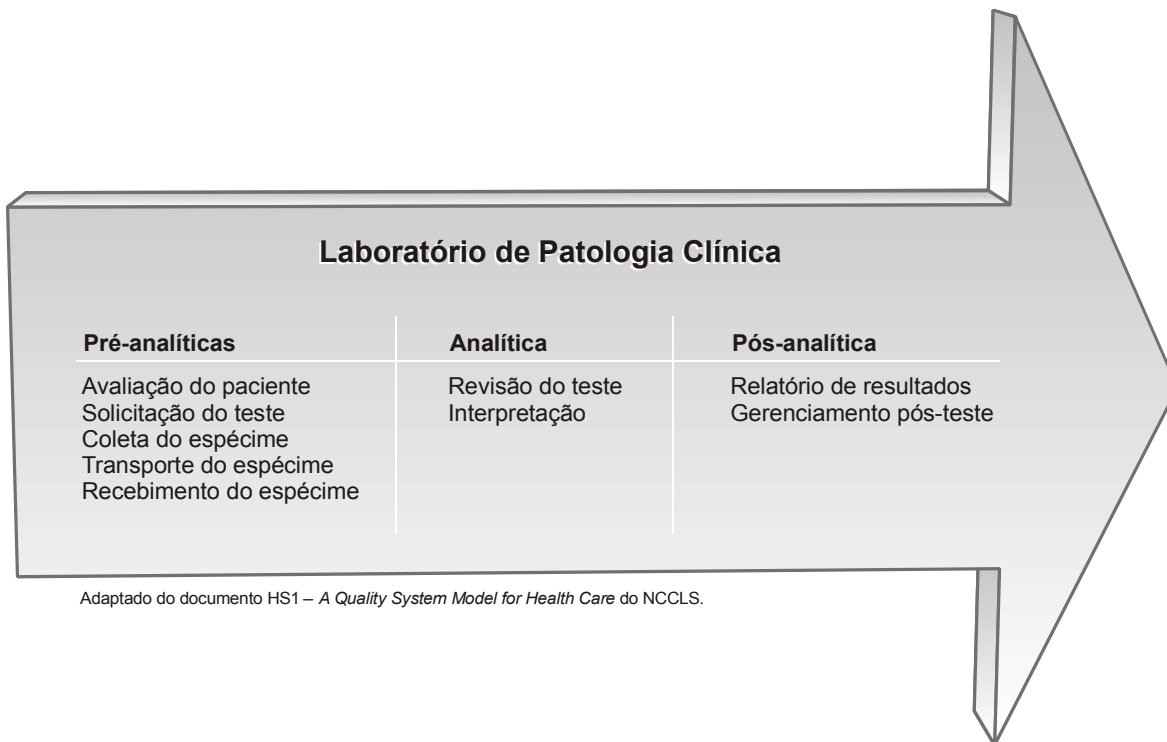
A Norma M38-A trata dos seguintes elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQs):

| 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.

Etapas do Fluxograma

Uma etapa do fluxograma é a descrição dos passos necessários para fornecer um determinado produto ou serviço da 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 rotas de fluxograma relativas a outras atividades de atenção à saúde, e.g., serviços respiratórios, serviços de imagens, etc., ou a outros tipos de organizações, e.x., fabricantes de dispositivos médicos, irão diferir das dos laboratórios de patologia clínica. Toda rota de fluxograma descreve a seqüência das atividades necessárias ao fornecimento dos produtos ou serviços de uma organização ou entidade específica. Para os documentos relacionados com outras rotas de fluxograma, o ícone refletirá passos diferentes do processo.

Se o documento for específico para os processos ou procedimentos dos laboratórios de patologia clínica, o seguinte quadro indicará qual(is) passo(s) processual(is) está(ão) incluído(s) no documento específico.

A Norma M38-A focaliza os Seguintes Passos na Rota de 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 Determinar a Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada

1. Introdução

O método descrito neste documento destina-se à realização de testes dos fungos filamentosos mais

comuns que causam infecções invasivas. Esses fungos abrangem as espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus*; *Pseudallescheria boydii*; e a forma miceliana de *Sporothrix schenckii*. Embora outros fungos monilaceos e dematiaceos oportunistas tenham sido avaliados,⁵ é indispensável ter cuidado na interpretação dos resultados de CIM de outras combinações fungo/droga. O método não tem sido usado em estudos da fase leveduriforme dos fungos dimórficos, como *Blastomyces dermatitidis*, ou *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum*, ou *Penicillium marneffeii*, ou *S. schenckii*.

A norma M38-A do NCCLS é uma norma de “referência” desenvolvida mediante o processo consensual para facilitar acordo entre os laboratórios na determinação da sensibilidade dos fungos aos agentes antifúngicos. É necessário frisar que a correlação entre os dados *in vitro* e *in vivo* só foi tentada em modelos animais.³ Um importante uso dos métodos de referência é fornecer uma base padrão a partir da qual outros métodos podem ser desenvolvidos, o que também resultará num acordo entre os laboratórios, dentro de faixas específicas. Esses métodos podem ter vantagens especiais, como facilidade de execução, economia, ou resultados mais rápidos; portanto, seu desenvolvimento é muito desejável. Se o método produz resultados concordantes com o método de referência, será considerado em conformidade com a Norma M38-A do NCCLS.

1.1 Escopo

Este documento descreve um método para testar a sensibilidade de fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas a agentes antifúngicos. Esses fungos incluem as espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii*, bem como outros fungos patogênicos. O documento focaliza as condições de teste, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, o tempo e a temperatura de incubação, a formulação do meio e os critérios para a determinação da CIM.

Esta norma focaliza também o meio de cultivo sintético RPMI-1640 completamente definido para testes de fungos, devido a exemplos da adequação desse meio aos testes de sensibilidade da levedura aos agentes antifúngicos.^{1,2}

Faz-se referência à preparação da solução padrão das drogas e aos testes de diluição apresentados na Norma M27 *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast* do NCCLS.

1.2 Definições

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

Concentração inibitória mínima (CIM), *n* – A menor concentração 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

Os padrões ou pós de referência antifúngicos podem ser obtidos comercialmente, diretamente do fabricante, ou da empresa United States Pharmacopeia (12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852). **Não usar** soluções padrão da farmácia e outros preparados clínicos. Os pós aceitáveis têm o

nome genérico da droga no rótulo, bem como sua potência em ensaios (geralmente expressada em microgramas [µg] ou Unidades Internacionais por mg de pó) e a data de vencimento. Os pós devem ser armazenados seguindo as instruções do fabricante, ou a -20° C, ou menos, num dessecador, de preferência no vácuo. Quando o dessecador é retirado do congelador, deve permanecer a temperatura ambiente antes de ser aberto (para evitar a condensação de água).

2.2 Pesagem dos Pós Antifúngicos

Todos os agentes antifúngicos devem ser submetidos a um ensaio para determinar suas unidades padrão de atividade. As unidades do ensaio podem diferir amplamente do peso real do pó e, com frequência, diferem dentro de cada lote de produção da droga. Por isso, o laboratório deve normatizar suas soluções antifúngicas com base nos ensaios dos lotes de antifúngicos em pó que estão sendo usados.

Ambas as equações a seguir podem ser usadas para determinar a quantidade de pó ou diluente necessária para a solução padrão:

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

ou

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

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

Exemplo: Para preparar 100mL de uma solução padrão contendo 1280µg de agente antifúngico por mL, usando um pó antifúngico cuja potência é 750 µg/mg, utilize 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, colocou-se pó na balança até chegar a 182,6mg. Com essa quantidade de pó pesado, utilizou-se a equação (2), anterior, para determinar a quantidade de diluente a ser medida:

(4)

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

(Concentração desejada)

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

2.3 Preparação das Soluções Padrão

As soluções padrão de antifúngicos são preparadas em concentrações de, pelo menos, 1280µg/mL ou dez vezes a concentração mais alta a ser testada, a que for maior. Há alguns agentes antifúngicos de solubilidade limitada, entretanto, que podem precisar de 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, com Exceção de Água

Algumas drogas devem ser dissolvidas em solventes outros que água (ver a Tabela 1). As informações sobre a solubilidade de um produto antifúngico devem estar anexadas à droga. Essas drogas devem ser dissolvidas em concentrações pelo menos 100X mais altas, do que a maior concentração de teste desejada. Os agentes mais freqüentemente usados incluem: dimetilsulfóxido de qualidade analítica (DMSO), álcool etílico, polietileno glicol e carboxi-metil-celulose. Quando esses solventes forem empregados, recomenda-se preparar uma série de diluições da solução padrão do antifúngico, a 100 vezes a concentração final, no mesmo solvente. A seguir, cada solução intermediária deverá ser diluída até a concentração final no meio de cultivo do teste (ver a Tabela 1). Esse procedimento impede os artefatos de diluição resultantes da precipitação de produtos de baixa solubilidade no meio aquoso.

Por exemplo, para preparar uma série de microdiluições em caldo para os testes, contendo uma droga insolúvel em água, mas que pode ser dissolvida em DMSO, cuja concentração desejada mais alta é 16µg/mL, pesa-se primeiro 4,8mg (assumindo uma potência de 100%) do pó de agente antifúngico, que é dissolvido em 3,0mL de DMSO. Isso resulta numa solução padrão de 1.600µg/mL. A seguir, preparam-se mais diluições dessa solução padrão em DMSO (ver a Tabela 2). As soluções em DMSO serão diluídas na razão de 1:50 no meio de teste (ver a Seção 3.2) e diluídas novamente, na mesma razão, quando inoculadas (ver a Seção 3.4); a concentração final do solvente, reduzida para DMSO a 1% (sem a droga), deve ser usada no teste como controle de diluente.

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

2.3.2 Filtragem

Em geral, as soluções padrão não se contaminam, podendo-se assumir que são estéreis. Para assegurar a esterilidade, pode-se filtrar a solução através de uma membrana-filtro. Os filtros de papel, amianto, ou vidro, 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 mediante os 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 a temperatura de -60°C ou menos, mas nunca a temperaturas superiores a -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 da maioria dos agentes antifúngicos podem ser armazenadas a -60°C , ou menos, durante seis meses, ou mais, sem perda significativa de atividade.⁶ 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 ser constatado nos resultados dos testes de sensibilidade usando 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 os resultados esperados para as cepas de controle de qualidade disponíveis. Com base em estudos anteriores, as seguintes faixas de concentração de drogas podem ser relevantes: anfotericina B – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; flucitosina – de 0,125 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$; cetoconazol – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; itraconazol e os novos triazólicos – de 0,0313 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e fluconazol – de 0,125 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.5 Seleção dos Agentes Antifúngicos para Testes e Relatórios de Rotina

Não se recomenda realizar testes de sensibilidade a antifúngicos de rotina. Em cada instituição, a decisão sobre realizar, ou não, testes de sensibilidade a antifúngicos deve ser tomada em colaboração com os especialistas em doenças infecciosas, o farmacêutico, os comitês de terapêutica e de controle de infecções e os profissionais de microbiologia clínica.

2.5.1 Nomes Genéricos

Para minimizar confusão, deve-se usar os nomes genéricos de todos os agentes antifúngicos.

2.5.2 Número de Agentes Testados

No caso dos laboratórios que realizam testes de sensibilidade a antifúngicos, os testes com anfotericina B e itraconazol podem fornecer informações práticas para ajudar a minimizar erros e adotar um esquema prático de testes. Além disso, os laboratórios podem realizar testes com outros agentes, ex., os novos triazólicos, à medida que ficarem disponíveis.

2.5.3 Diretrizes para Relatórios Seletivos

É válido realizar testes em determinadas circunstâncias: como parte de levantamentos periódicos de baterias de testes visando a estabelecer os antibiogramas de coleções de isolados patogênicos provenientes da própria instituição e para auxiliar na determinação da terapia para infecções invasivas por fungos filamentosos quando a utilidade dos agentes antifúngicos azólicos é incerta. Não há pontos de corte disponíveis para interpretar os resultados de testes de qualquer espécie de fungo filamentoso contra qualquer agente antifúngico, e a relevância clínica dos testes de qualquer combinação organismo-droga permanece incerta. Os espécimes para as culturas e outros testes devem ser obtidos antes de se iniciar terapia com antifúngicos.

3. Metodologia do Teste

3.1 Meio Líquido

3.1.1 Meio de Cultivo Sintético

O meio de cultivo sintético RPMI-1640 é completamente definido (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH) é considerado satisfatório para ensaios com fungos filamentosos, sendo utilizado para padronização desta norma.^{1,2} A fórmula desse meio é apresentada na Tabela 5 e a preparação do meio a partir do pó, delineada no Apêndice A.

3.1.2 Tampão

Os meios de cultivo devem ser tamponados até um pH de $7,0 \pm 0,1$ em temperatura de 25° C. Deve-se selecionar um tampão que não antagonize os agentes antifúngicos. O tampão Tris não é satisfatório porque antagoniza a atividade da flucitosina. Os tampões Zwitterion são preferíveis aos tampões que atravessam facilmente a membrana celular, como os fosfatos, porque, teoricamente, esses últimos podem produzir interações inesperadas com agentes antifúngicos. O MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) é considerado satisfatório em concentração final de 0,165 mol/L para 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 a temperatura ambiente (25° C). O desempenho da CIM de cada lote

Página: 22
do meio de cultivo em caldo deve ser avaliada usando um conjunto padrão de organismos de controle de qualidade (ver a Seção 4).

3.2 Preparação das Diluições de Agentes Antifúngicos

As

Página: 22
etapas para preparação e armazenamento das diluições dos agentes antifúngicos são as seguintes:

- (1) Usar tubos de ensaio estéreis de plástico para preparar as diluições das drogas e placas de microdiluição com múltiplos poços, estéreis e descartáveis (96 poços em forma de U) para realizar os testes.
- (2) Usar um poço de controle do crescimento contendo meio RPMI-1640 sem agentes antifúngicos (mas com solvente não aquoso, quando necessário) para cada organismo testado.

Quando se precisa de diluições 2X de agentes antifúngicos solúveis em água, estas podem ser preparadas volumetricamente em caldo (Tabela 3). O procedimento para 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 na Tabela 2.

O volume total de cada diluição a ser preparada depende do número de testes a serem realizados. Visto que se usa 0,1mL de cada diluição de droga antifúngica para cada teste, 1,0mL será suficiente para aproximadamente oito testes (uma bandeja de microdiluição) quando se usa pipeta. Utiliza-se uma pipeta apenas para medir 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 nesse conjunto. As soluções de trabalho do antifúngico são 2X mais concentradas do que as concentrações finais, porque ocorre uma diluição 1:2 das drogas quando combinadas com o inóculo.

No caso de agentes antifúngicos que não podem ser preparados como soluções padrão em água, como

cetoconazol, anfotericina B, ou itraconazol, deve-se preparar uma série de diluições do agente, a primeira 100X a concentração final num solvente apropriado (ver a Seção 2.3.1). A seguir, cada solução não aquosa deve ser diluída 1:50 em meio 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 e a Tabela 2). Para preparar volumes de 5mL do agente antifúngico diluído (suficiente para 45 testes), pipetam-se primeiro volumes de 4,9mL do meio RPMI-1640 em cada tubo de ensaio estéril, num total de dez. A seguir, usando uma única pipeta, acrescenta-se 0,1mL de DMSO puro a um lote de 4,9mL de meio (meio de controle), seguido por 0,1mL da menor concentração (3,13µg/mL) da droga em DMSO, mais 0,1mL da concentração 6,25µg/mL, continuando-se, em seqüência, por toda a série de concentrações, acrescentando-se cada vez 0,1mL volumes a 4,9mL do meio. Esses volumes podem ser ajustados dependendo do número total de testes necessários. Visto que haverá uma diluição 1:2 das drogas quando combinadas com o inóculo, as soluções de trabalho dos agentes antifúngicos são 2X mais concentradas do que as concentrações finais.

3.3 Preparação do Inóculo

Quando há risco substancial de respingo ou aerossolização, o teste deve ser realizado em cabine de segurança biológica de Classe IIA ou IIB. A Norma M29-*Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* do NCCLS fornece uma descrição detalhada dos procedimentos. Estudo inicial demonstrou que é possível preparar suspensões confiáveis de esporangiosporos ou conídios não germinados usando o espectrofotômetro,^{7,8,9} e que as concentrações de inóculos viáveis de esporangiosporos ou conídios para testes na faixa de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, aproximadamente, forneciam os dados mais reprodutíveis.^{1,2} Para induzir a formação de conídios e esporangiosporos, a maioria dos fungos (espécies de *Aspergillus*, *P. boydii*, *R. arrhizus* e *S. schenckii*) deve ser cultivada em ágar batata-dextrose de durante 7 dias, a 35° C. As espécies de *Fusarium* devem ser incubadas de 48 a 72 horas, a 35° C, e, depois, até o sétimo dia, a temperatura de 25 a 28° C. Deve-se cobrir as colônias de sete dias com aproximadamente 1mL de solução salina estéril a 0,85% e preparar uma suspensão mexendo delicadamente as colônias com a ponta de uma pipeta de transferência. Acrescentar uma gota (aproximadamente 0,01mL) de Tween 20 que facilitará a preparação dos inóculos de *Aspergillus*. A mistura resultante de conídios ou esporangiosporos e fragmentos de hifas é retirada e transferida para um tubo de ensaio estéril. Quando as partículas mais pesadas se depositarem no fundo, após 3 a 5 minutos, a suspensão homogênea superior deverá ser transferida para um tubo estéril, fechando-se a tampa firmemente, e homogeneizada em um agitador de tubos durante 15 segundos. (PRECAUÇÃO: Retirar as tampas com cuidado uma vez que o líquido aderido à tampa pode produzir aerossóis ao se abrir o tubo de ensaio.) As densidades das suspensões de conídios ou esporangiosporos são lidas e ajustadas para uma densidade óptica (DO) que varia de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%) para as espécies de *Aspergillus* e *S. schenckii* e de 0,15 a 0,17 (transmitância de 68 a 70%) para as espécies de *Fusarium*, *P. boydii* e *R. arrhizus*. Essas suspensões deverão ser diluídas 1:50 no meio padrão. As suspensões de inóculo de *P. boydii* podem exigir um fator de diluição mais baixo (50%). As diluições de inóculo 1:50 corresponderão a 2X a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, aproximadamente. O inóculo do teste deverá ser produzido em quantidade suficiente para inocular diretamente cada poço com 0,1mL da correspondente suspensão de inóculo diluído.

O inóculo pode ser quantificado colocando 0,01mL de uma diluição de 1:100 do inóculo ajustado numa placa de ágar Sabouraud-dextrose para determinar o número viável de UFC por mililitro.^{1,2,4,7} As placas serão incubadas a temperatura de 28 a 30° C e observadas diariamente para verificar a presença de colônias de fungos. As colônias devem ser contadas assim que possível após o

crescimento tornar-se visível, especialmente no caso de isolados de *R. arrhizus*. Os períodos de incubação deverão variar de 24 horas ou menos (*R. arrhizus*) a 5 dias (*P. boydii*).

3.4 Inoculação em Meio RPMI-1640

No dia do teste, cada poço deve ser inoculado com 0,1mL da suspensão de 2X do inóculo de conídios ou esporangiosporos. Esta etapa diluirá as concentrações da droga, as densidades do inóculo e de solvente, se usado, nas concentrações finais desejadas. Os poços do controle de crescimento deverão conter 0,1mL da correspondente solução diluída de inóculo e 0,1mL do diluente a 2% da droga sem agente antifúngico (Ver a Seção 3.2). Os organismos de CQ e referência são testados da mesma maneira e incluídos em cada vez que um isolado é testado.

3.5 Incubação

Todas as placas de microdiluição são incubadas a 35° C, sem agitação. As placas contendo espécies de *Rhizopus* devem ser examinadas após um período que varia de 21 a 26 horas de incubação antes de se determinar os resultados de CIM. A maioria dos outros fungos filamentosos oportunistas, incluindo *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Sporothrix schenckii*, é avaliada após 46 a 50 horas de incubação. *P. boydii* é examinado após 70 a 74 horas.

3.6 Leitura dos Resultados

CIM é a menor concentração de um agente antifúngico que inibe substancialmente o crescimento do organismo visualmente detectado. No teste convencional de microdiluição, o crescimento em cada poço de CIM é comparado com o do controle de crescimento com o auxílio de espelho de leitura. A seguir, cada poço de microdiluição recebe um escore numérico, da seguinte maneira: 4 = nenhuma redução do crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento ou aproximadamente 75% do crescimento do controle (meio isento de droga); 2 = redução proeminente de crescimento ou aproximadamente 50% do crescimento do controle; 1 = ligeiro crescimento ou aproximadamente 25% do crescimento do controle; e 0 = opticamente claro ou ausência de crescimento.

3.6.1 Anfotericina B

Para anfotericina B, os pontos finais são tipicamente bem definidos, sendo fácil ler a CIM como a menor concentração da droga que proporciona qualquer grau de crescimento discernível (escore 0). Em geral, não são vistos pontos finais mal definidos (trailing). Este padrão pode refletir resistência clinicamente relevante à droga.

3.6.2 Flucitosina, Fluconazol e Cetoconazol

Para flucitosina, e especialmente para os azólicos, como fluconazol e cetoconazol, os pontos finais da reação são menos definidos do que os descritos para anfotericina B, o que pode se constituir em fonte significativa de variabilidade. A aplicação de um ponto final menos rigoroso (permitindo alguma turbidez acima da CIM) tem melhorado a concordância entre laboratórios. Para essa classe de droga, a turbidez permitida corresponde a uma redução de aproximadamente 50% (metade ou mais) no crescimento, comparado com o crescimento no poço de controle (meio isento de droga). Se persistir, essa turbidez será geralmente idêntica para todas as concentrações da droga acima da CIM. Pode-se usar cepas de referência de sensibilidade definida na capacitação do profissional de laboratório em treinamento.

3.6.3 Itraconazol

Para itraconazol e os novos triazólicos, posaconazol, ravuconazol e voriconazol, os pontos finais da reação são, em geral, facilmente definidos e a CIM pode ser lida como a menor concentração da droga que proporciona qualquer grau de crescimento discernível (100% de inibição, ou escore numérico de 0). Em geral, não são encontrados pontos finais da reação mal definidos (trailing) com esses agentes contra *Aspergillus* spp. e a maioria dos outros fungos patogênicos oportunistas. É possível que esse tipo de padrão reflita resistência clinicamente relevante à droga, conforme foi demonstrado para cepas de *A. fumigatus* clinicamente resistentes ao itraconazol.^{4,10,11}

3.7 Interpretação dos Resultados

Até agora não foram estabelecidos os pontos de corte para a interpretação dos resultados. A relevância clínica dos testes desse grupo de fungos patógenos continua incerta.

3.7.1 Anfotericina B

Até agora, a experiência com os testes descritos nesta norma indica que as CIMs de anfotericina B contra a maioria dos isolados de fungos filamentosos oportunistas agrupam-se em torno de 0,5 e 2,0 µg/mL. Entretanto, as CIMs de anfotericina B contra algumas espécies (*A. terreus*, *Acremonium strictum*, *S. apiospermum* e *S. prolificans*) podem ultrapassar 2 µg/mL (faixas de CIM de 2 a 16 µg/mL).⁵ Embora poucos dados estejam disponíveis sobre a correlação entre a CIM e o resultado do tratamento com anfotericina B no caso de fungos filamentosos, CIMs superiores a 2 µg/mL têm sido associadas com fracasso dos tratamentos e CIMs inferiores a 2 µg/mL, com cura clínica em 28 pacientes tratados com anfotericina B para aspergilose invasiva causada por *A. fumigatus* (8 casos), *A. flavus* (12 casos) e *A. terreus* (9 casos).¹²

3.7.2 Flucitosina

Em geral, os fungos filamentosos não são suscetíveis a flucitosina e a maioria das CIMs são > 64 µg/mL no caso desses isolados. As exceções incluem alguns isolados de espécies de *Aspergillus* e fungos escuros (dematiaceous).

3.7.3 Fluconazol

Os fungos filamentosos não são normalmente suscetíveis a fluconazol e a maioria das CIMs são > 64 µg/mL no caso desses isolados. As exceções são alguns isolados dos fungos dimórficos e dermatófitos.

3.7.4 Cetoconazol

Até a data, a experiência usando os testes descritos nesta norma indica que as CIMs desta droga contra fungos variam de 0,0313 a 16 µg/mL. Entretanto, ainda não há dados disponíveis indicando uma correlação entre a CIM e o resultado de tratamento com cetoconazol.

3.7.5 Itraconazol e os Novos Triazólicos

É impossível enfatizar suficientemente a importância da preparação correta das diluições da droga no caso deste produto insolúvel.⁷ (Ver a Norma M27 - *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts* do NCCLS.) O uso de solventes incorretos ou qualquer desvio do

esquema de diluição sugerido na Tabela 2 pode levar a erros substanciais resultantes da presença de artefatos de diluição. Como ocorre com o cetoconazol, a experiência obtida até a data usando os testes descritos nesta norma indica que as CIMs de itraconazol contra fungos variam de 0,0313 a 16µg/mL. Entretanto, dados preliminares indicam que os valores altos de CIM do itraconazol (>8µg/mL) estão associados com resistência clínica a esse agente^{10,11}, quando as CIMs são determinadas após 48 horas de incubação usando o método de microdiluição da Norma M38-A.⁴ Não há dados disponíveis que indiquem uma correlação entre a CIM e o resultado do tratamento com os novos triazólicos.

3.8 Modificações na Macrodiluição em Caldo

Há dados publicados documentando uma boa concordância entre os resultados obtidos com a metodologia de microdiluição em caldo descrita anteriormente e uma adaptação da macrodiluição em caldo.^{1,2} Alguns laboratórios de patologia clínica podem optar pela a implementação de testes de macrodiluição em caldo ao invés do método de microdiluição em caldo devido, principalmente, a questões de segurança. Os passos e as condições de teste relevantes ao teste de macrodiluição em caldo são discutidos de maneira detalhada.

As diluições 100X da droga, descritas para o teste de microdiluição em caldo, devem ser diluídas 1:10 com RPMI para se conseguir a concentração 10X necessária para o teste de macrodiluição em caldo. As suspensões padrão do inóculo são preparadas e ajustadas conforme descrito para os testes de microdiluição em caldo. A suspensão padrão de conídios ou esporangiosporos é agitada durante 15 segundos com vórtex e diluída 1:100 com o meio para obter o inóculo do teste (de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL).

Coloca-se 0,1mL das concentrações 10X da droga em tubos de ensaio estéreis 12 x 75-mm. Esses tubos podem ser selados em sacos de plástico e mantidos congelados a -70° C até seis meses, sem deterioração da potência da droga. Cada tubo é inoculado no dia do teste com 0,9mL da correspondente suspensão diluída do inóculo, o que leva as diluições da droga e as densidades do inóculo às concentrações finais definidas no método de microdiluição. O tubo de controle do crescimento recebe 0,1mL do diluente 10X da droga sem agente antifúngico e, depois, inoculado com 0,9mL das suspensões correspondentes do inóculo diluído. Os organismos de CQ são testados da mesma maneira e incluídos sempre que se testa um isolado.

Os tubos são incubados a 35° C (sem agitação) e observados para se verificar a presença ou ausência de crescimento visível. Os tubos recebem um escore e as CIMs são determinadas conforme descrito nas instruções do teste de microdiluição em caldo.

3.9 Outras Modificações

Dados preliminares demonstraram que a determinação das CIMs usando um ponto final colorimétrico aumenta a concordância dos resultados dos diferentes laboratórios no caso das CIMs de itraconazol.^{2,9} Esse procedimento pode ser realizado acrescentando-se um indicador colorimétrico 2X (resazurina modificada) a uma concentração 2X do meio RPMI padrão e seguindo os passos descritos anteriormente para o teste de microdiluição ou sua modificação.

Para o procedimento colorimétrico, examinam-se os poços para verificar se houve mudança de cor de azul (indicando ausência de crescimento) para roxo (indicando inibição parcial), ou para vermelho (indicando crescimento). A CIM de um azólico é a concentração de droga que apresenta uma pequena mudança de cor de azul para roxo e a de anfotericina B, a concentração da droga que não mostra mudança de cor ou o primeiro poço que continua azul.

4. Controle de qualidade

4.1 Propósito

As metas dos programas de controle de qualidade são monitorar os seguintes elementos.

A precisão e acurácia dos testes de sensibilidade.

O desempenho dos reagentes, das condições de teste e das instruções usadas nos testes.

O desempenho das pessoas que realizam os testes e fazem a leitura dos 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 com o método específico de controle.^{13,14,15}

4.2 Responsabilidades de Controle de Qualidade

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

Os fabricantes são responsáveis pelos seguintes elementos:

estabilidade do antifúngico;

identificação do antifúngico;

potência das soluções padrão de antifúngico;

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 de produtos comerciais 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) mais prováveis a causar problemas de 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 CIMs próximas a concentração média, para todos os agentes antifúngicos testados. Uma cepa de controle ideal é inibida na quinta diluição de uma série $-\log_2$ de nove diluições, mas as cepas com CIMs 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 padrão 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 a seleção de cepas de controle de qualidade apropriadas e determinação de faixas de CIM aceitáveis. As cepas de CQ relacionadas na Tabela 4 foram selecionadas de acordo com os critérios da Norma M23 e podem ser usadas como controle nos testes de sensibilidade de fungos aos agentes antifúngicos, até que isolados de fungos sejam selecionados. Além disso, pode-se usar os isolados de fungos de referência relacionados na Tabela 4.

4.4 Armazenamento das Cepas de Referência

4.4.1 Métodos de Armazenamento Prolongado e de Curto Prazo

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

Há três métodos de preferência para o armazenamento prolongado de cepas de referência. Os isolados fúngicos podem ser cultivados em ágar batata-dextrose e depois congelados a -70°C .¹⁶

Alternativamente, as cepas de referência podem ser preservadas suspendendo as células fúngicas em solução de glicerol a 50% ou na solução criogênica de frascos comerciais contendo contas porosas cuja capacidade de preservação de fungos tenha sido demonstrada pelo fabricante. Os frascos podem ser armazenados seja a -70°C , em nitrogênio líquido, ou em vapor de nitrogênio líquido.¹⁷

Para armazenamento de curto prazo, as culturas padrão de trabalho devem ser cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose até se observar crescimento suficiente, sendo depois armazenadas a temperatura de 2 a 8°C . Os tubos com meios inclinados frescos 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.

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®],^b de fontes comerciais com história documentada da cultura, ou de instituições de referência com capacidade demonstrada de armazenar e usar os organismos de maneira consistente, com contaminação mínima). Deve-se obter uma cultura padrão nova sempre que se constatar um desvio significativo do ponto final esperado.

4.4.3 Preparação das Cepas para Armazenamento

^b ATCC® é a marca registrada da American Type Culture Collection.

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

Cultivar as espécies de *Candida* durante a noite, seja em ágar Sabouraud-dextrose seja em ágar enriquecido com digerido de soja-caseína. Cultivar os fungos durante sete dias em ágar batata-dextrose.

Selecionar o crescimento de várias colônias e realizar testes de sensibilidade apropriados para demonstrar que fornecem os resultados de CIM esperados (ver a Tabela 4 para as CIMs esperadas de duas cepas de referência). Em geral, os fungos precisam um período de incubação maior (cinco a sete dias).

Realizar uma subcultura das cepas que produziram os resultados esperados no mesmo meio usado para a cultura primária e incubar durante um período bastante longo para que ocorra crescimento suficiente (em geral, de um a três dias).

Examinar com cuidado o crescimento resultante para se certificar da pureza da cultura.

Suspender o crescimento no fluido estabilizante para fazer uma suspensão densa (ou, se estiver liofilizado, suspender o crescimento no meio apropriado).

Distribuir pequenos volumes (uma ou duas gotas) da suspensão turbida entre recipientes estéreis adequados.

Colocar esses recipientes num congelador mantido conforme indicado na Seção 2.3.3 ou em nitrogênio líquido.

As soluções padrão preparadas usando o procedimento delineado anteriormente podem ser mantidas indefinidamente sem risco significativo de alteração nos padrões 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 das Cepas de Referência na Rotina dos Ensaios

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

Retirar o recipiente da cultura do congelador ou obter um frasco liofilizado.

Deixar descongelar a mistura congelada ou reidratar a cultura liofilizada.

Para espécies de *Candida*, transferir uma parte da mistura para ágar Sabouraud-dextrose e incubar, a 35° C, durante 24 horas. Realizar um subcultivo do fungo em ágar batata-dextrose e incubar durante sete dias.

Retirar quatro ou cinco colônias, realizar subculturas no meio para os testes de sensibilidade apropriados e, a seguir, realizar subculturas em tubo inclinado com ágar enriquecido com digerido de soja-caseína.

Após incubar as cepas durante a noite, elas devem ser armazenadas a temperatura de 2 a 8° C.

Realizar as subculturas, numa placa de ágar, a partir do tubo inclinado.

Realizar sempre os testes de sensibilidade em colônias de placas cultivadas durante a noite (espécies de *Candida*) ou culturas de sete dias (bolor).

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

4.6 Controle de Lotes de Meio e Lotes de Equipamento de Plástico

Para controle de lotes de meio e conjuntos de equipamento de plástico, o procedimento pode ser dividido nos seguintes passos.

- (1) Testar cada novo lote de meio ou conjuntos de placas de microdiluição ou tubos de macrodiluição usando uma das cepas de controle de qualidade relacionadas na Tabela 4 para determinar se as CIMs estão dentro da faixa esperada; 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 Frequência dos Testes de Controle de Qualidade

4.7.1 Faixas de CIM

A Tabela 4 apresenta as faixas de precisão de CIM para um único teste de controle. Em geral, um dentre 20 valores de CIM, numa série de 20 testes consecutivos, pode estar fora do controle (ex., fora da faixa definida) devido a variações aleatórias do teste. Dois resultados fora-do-controle consecutivos, ou mais de 2 resultados fora-do-controle 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, ou invés de diários (ver a Seção 4.7.2).

4.7.2 Frequência dos Testes

Para monitorar o desempenho geral de um sistema de testes, recomenda-se incluir cepas de referência apropriadas todo dia que o teste for realizado. Entretanto, a frequência 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 (ex., valores de CIM obtidas para uma combinação droga-microorganismo durante 30 dias consecutivos de testes) podem estar fora das faixas de acurácia definidas na Tabela 4.

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, definidos na Seção 4.7.1.

(3) A avaliação do desempenho geral do sistema de testes (conforme delineado anteriormente) deve ser recomeçada (ex., monitorada durante 30 dias consecutivos de testes) toda vez que um reagente for trocado (novo lote de droga padrão ou novo lote de organismos de CQ congelados).

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

Testar com cepas de referência apropriadas durante cinco dias consecutivos de testes.

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 das faixas de acurácia definidas na Tabela 4.

(5) Se não for possível documentar a resolução de um problema (ex., constata-se que pelo menos um dos cinco valores de CIM está fora da faixa de acurácia), será preciso continuar a realizar testes de controle diários. Só será possível voltar a realizar os testes de controle em base semanal após documentar desempenho satisfatório durante mais de 30 dias consecutivos de testes, conforme definido 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 Procedimentos de Controle

4.8.1 Controle do Crescimento

Cada série de testes de microdiluição ou macrodiluição em caldo deve incluir um controle do 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 da reação.

4.8.2 Controle de Pureza

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

4.8.3 Controle da Interpretação dos Pontos Finais da Reação

A interpretação dos pontos finais da reação deve ser monitorada periodicamente para minimizar possíveis variações na interpretação dos pontos finais do teste de CIM entre os observadores. Todo o 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 laboratorista experiente. As cepas de referência específicas usadas para predeterminar as CIMs são particularmente úteis para esta finalidade, especialmente com itraconazol.

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 CIMs consistentemente próximos ao ponto médio da faixa de concentrações testada para todos os agentes antifúngicos; ex., uma cepa de controle ideal será inibida na quarta diluição de uma série de sete diluições, embora as cepas com valores de CIMs na terceira ou na quinta diluição também seriam aceitáveis.

A Tabela 4 relaciona as faixas previstas para as cepas consideradas aceitáveis como cepas de controle de qualidade para os testes de leveduras. Além disso, são apresentadas cepas adicionais que podem ser úteis para realizar estudos de referência.²

Referências Bibliográficas

- Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemoutro*. 1995; 39:314-319.
- 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.
- Odds F, Van Gerven F, Espinel-Ingroff A, et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibility of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemoutro*. 1998; 42:282-288.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, et al. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp. NCCLS Collaborative evaluation. *Antimicrob Agents Chemoutro*. 2001; 45:1828-1835.
- Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Foutrogill A, Rinaldi M. Evaluation of NCCLS susceptibility testing conditions for established and new antifungal agents against emerging monilaceous and dematiaceous mould pathogens. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10).
- Anhalt JP, JA Washington 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.
- Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 1991;29:393-394.
- 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.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, White T. Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
- Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemoutro*. 1997; 41:1364-1368.
- Denning DW, Radford SA, Oakley KL, et al. Correlation between *in-vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in-vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infecção. *J Antimicrob Chemoutro*. 1997; 40: 401-414.
- Lass-Florl C, Kofler G, Kropshofer G, et al. In vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemoutro*. 1998;42: 497-502.
- Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1104-1107.

Rex J }I, Pfaller MA, Lancaster M, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol.* 1996;34:816.

Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Controle de qualidade limits for broth microdilution susceptibility testing of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3457-3459.

Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70 °C. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1000-1004.

Espinel-Ingroff, A, Montero O, Morrillo D. Viability of yeasts and filamentous fungi isolates maintained in liquid nitrogen and at -70 °C by using commercially prepared cryogenic vials. In press.

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 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 escala de McFarland 0,5

Para padronizar a densidade do inóculo, utiliza-se um padrão de turbidez de BaSO₄ (Solução Padrão da escala 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).

Verificar a densidade correta da solução padrão de turbidez usando um espectrofotômetro com via de luz de 1cm e cubeta correspondente para determinar a absorbância. A 625nm, a absorbância deverá ser de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland 0.5.

Colocar de 4 a 6mL em tubos com tampas de rosca, do mesmo tamanho dos usados para cultivar ou diluir o inóculo.

Fechar bem os tubos e armazená-los em câmara escura, a temperatura ambiente.

Agitar vigorosamente esse padrão de turbidez num agitador de vórtex mecânico imediatamente antes de usar.

Substituir as soluções padrão ou verificar novamente as densidades três meses após preparadas.

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

| Agente Antifúngico | Solvente (Soluções com Concentração Máxima e Intermediária) | Dilute (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 |

*Dimetilsulfóxido

Tabela 2. 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)* | = | 2x Concentração Final de 1:5 (µg/mL)† | Log ₂ |
| 1 | 1,600 | Padrão | | | | | 1.600 µg/mL | | 32 | 4 |
| 2 | 1,600 | Padrão | 0,5 | | 0,5 | | 800 | | 16 | 3 |
| 3 | 1,600 | Padrão | 0,5 | | 1,5 | | 400 | | 8,0 | 2 |
| 4 | 1,600 | Padrão | 0,5 | | 3,5 | | 200 | | 4,0 | 1 |
| 5 | 200 | Passo 4 | 0,5 | | 0,5 | | 100 | | 2,0 | 0 |
| 6 | 200 | Passo 4 | 0,5 | | 1,5 | | 50 | | 1,0 | -1 |
| 7 | 200 | Passo 4 | 0,5 | | 3,5 | | 25 | | 0,5 | -2 |
| 8 | 25 | Passo 7 | 0,5 | | 0,5 | | 12,5 | | 0,25 | -3 |
| 9 | 25 | Passo 7 | 0,5 | | 1,5 | | 6,25 | | 0,125 | -4 |
| 10 | 25 | Passo 7 | 0,5 | | 3,5 | | 3,13 | | 0,0625 | -5 |

* Dimetilsulfóxido

† Concentração 2x

Tabela 3. 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) | = | 2x Concentração Final de 1:5 (µg/mL) | Log ₂ |
| 1 | 5120 | Padrão | 1 mL | | 7 | | 640 µg/mL | | 128 | 6 |
| 2 | 640 | Passo 1 | 1,0 | | 1,0 | | 320 | | 64 | 5 |
| 3 | 640 | Passo 1 | 1,0 | | 3,0 | | 160 | | 32 | 4 |
| 4 | 160 | Passo 3 | 1,0 | | 1,0 | | 80 | | 16 | 3 |
| 5 | 160 | Passo 3 | 0,5 | | 1,5 | | 40 | | 8 | 2 |
| 6 | 160 | Passo 3 | 0,5 | | 3,5 | | 20 | | 4 | 1 |
| 7 | 20 | Passo 6 | 1,0 | | 1,0 | | 10 | | 2 | 0 |
| 8 | 20 | Passo 6 | 0,5 | | 1,5 | | 5 | | 1,0 | -1 |
| 9 | 20 | Passo 6 | 0,5 | | 3,5 | | 2,5 | | 0,5 | -2 |
| 10 | 2,5 | Passo 9 | 1,0 | | 1,0 | | 1,25 | | 0,25 | -3 |
| 11 | 2,5 | Passo 9 | 0,5 | | 1,5 | | 0,625 | | 0,12 | -4 |
| 12 | 2,5 | Passo 9 | 0,5 | | 3,5 | | 0,3125 | | 0,0625 | -5 |

Tabela 4. Limites de CIM Recomendados para Duas Cepas de Referência e Controle de Qualidade para Testes de Diluição em Caldo. (Barry, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3457-3459. Pfaller MA, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1104-1107. Rex JH, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:816-817. Espinel-Ingroff A, et al. Multicenter evaluation of proposed standardization procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:139-143. Espinel-Ingroff A, et al. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 43: 1828-1835. Reproduzido mediante autorização dos autores e da American Society for Microbiology.)

| Organismo | Propósito | Agente Antifúngico | Faixa de CIM* (µg/mL) | % das CIMs dentro da Faixa |
|--|------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 | CQ | Anfotericina B | 0.5-4.0 | 99.1 |
| | | Fluconazol | 1.0-4.0 | 99.1 |
| | | Itraconazol | 0.12-0.5 | 99.0 |
| | | Cetoconazol | 0.06-0.5 | 99.0 |
| | | Posaconazol | 0.06-0.25 | |
| | | Ravuconazol | 0.03-0.25 | |
| | | Voriconazol | 0.03-0.25 | |
| | | 5FC | 0.12-0.5 | |
| <i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 | CQ | Anfotericina B | 1.0-4.0 | 99.5 |
| | | Fluconazol | 16-128 | 99.1 |
| | | Itraconazol | 0.25-1.0 | 94.0 |
| | | Cetoconazol | 0.25-1.0 | 100.0 |
| | | Posaconazol | 0.12-1.0 | |
| | | Ravuconazol | 0.25-1.0 | |
| | | Voriconazol | 0.12-1.0 | |
| | | 5FC | 8.0-32 | |
| <i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 204304 | Referência | Anfotericina B | 0.5-4 | 100.0 |
| | | Itraconazol | 0.2-0.5 | 100.0 |
| | | Posaconazol | 0.06-0.5 | 100.0 |
| | | Ravuconazol | 0.5-4 | 100.0 |
| | | Voriconazol | 0.5-4 | 100.0 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305 | Referência | Anfotericina B | 0.5-2 | 100.0 |
| | | Itraconazol | 0.12-1.0 | 100.0 |

* As faixas de CIM para isolados de CQ de *Candida* são valores de microdiluição após 48 horas de incubação; as faixas de CIM também estão disponíveis pelo método de macrodiluição (apenas 48 horas) e após 24 horas pelo método de microdiluição (Ver as referências acima).

Tabela 5. Composição do Meio RPMI-1640

| 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 |
| ácido L-aspártico | 0,020 | Cloreto de colina | 0,003 |
| L-cistina • 2HCl | 0,0652 | Ácido fólico | 0,001 |
| ácido L-glutâmico | 0,020 | Mio-inositol | 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 0,000005 |
| 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 de fenol, Na | 0,0053 |
| L-valina | 0,020 | | |

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

Resumo dos Comentários e das Respostas do Subcomitê

M38-P: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Proposed Standard*

Geral

1. O termo “formador de conídio” deveria ser eliminado, porque os Zygomycetes não produzem conídios.

O termo “formador de conídio” foi eliminado.

2. Por favor focalize as precauções de segurança no trabalho com fungos filamentosos em geral e, especificamente, com aqueles usados com o método de microdiluição em caldo.

Essa questão é focalizada na declaração das Precauções Padrão e na Seção 3.3.

3. O solvente para itraconazol e cetoconazol recomendado na norma proposta é o dimetilsulfóxido. Como solventes alternativos, pode-se relacionar, – 0,2 N HC (Shadomy et al. 1985); for itraconazole – 0.2M HCl in ethanol (Espinel-Ingroff, et al. 1984. *In vitro* studies with R 51211(itraconazole). *Antimicrob Ag Chemoth.* 26:5-9.)

Conforme descrito na Seção 2.3.1, o procedimento para preparar diluições de drogas recomenda evitar artefatos de diluição que resultam da precipitação de itraconazol e outros agentes de solubilidade limitada.

4. A metodologia geral do documento foi bem elaborada. O método foi recomendado para *Aspergillus*, *Fusarium*, *P. boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*. O método foi experimentado com a fase miceliana de *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Penicillium marneffei*?

Embora o método M38 tenha sido avaliado com outros fungos oportunistas emergentes e tenham sido publicados dados para os fungos dimórficos seguindo as condições padrão descritas nesse documento, não existem estudos colaborativos para esse último grupo.

5. Este documento não especifica se o método foi testado com fungos saprófitos, como *Paecilomyces*. Embora *Paecilomyces* seja considerado um contaminante ambiental normal, *Paecilomyces lilacinus*, entretanto, já foi documentado na literatura como patógeno resistente a anfotericina B.

Entre outros fungos patógenos emergentes, o subcomitê avaliou três isolados de *Paecilomyces lilacinus*, no âmbito de um estudo colaborativo (Referência 5). As MICs de anfotericina B foram >8 microgramas/mL nos três laboratórios participantes, sob as condições de teste da Norma M38-A.

6. Uma vez que os conídios são testados usando o método de determinação da CIM dos agentes fúngicos, alguns fungos filamentosos produzem muitos poucos, ou nenhum, conídios quando se

tornam atípicos. Uma dessas espécies é o *Aspergillus fumigatus*, que pode se tornar pleomórfico e, por isso, atípico. Essas cepas brancas de *Aspergillus fumigatus* com frequência deixam de produzir conídios, representando, portanto, um problema para a metodologia dos testes de agentes antifúngicos.

Alguns isolados podem exigir um período mais longo de incubação, mas a maioria produzirá, em algum momento, suficientes conídios para a determinação da CIM ou, então, pode-se testar usando as hifas como inóculo.

7. A preparação do inóculo exige suspensão de conídios não pigmentados ou de esporangiosporos. Portanto, esse método pode não ser apropriado para os fungos dematiaceos, uma vez que a pigmentação escura pode interferir na solução. Muitos fungos fortemente pigmentados permanecem sem esporular durante um longo tempo e, por isso, o método pode não ser adequado para esse grupo de fungos.

O subcomitê avaliou o método com algumas espécies de fungos dematiaceos em três laboratórios. A concordância entre os laboratórios foi superior a 90% nos testes de ambos os agentes estabelecidos e os sujeitos de investigação (Referência 5).

8. A acurácia do inóculo também pode ser prejudicada pela presença de hifas fúngicas, que são facilmente transferidas com os conídios e as células conidiógenas. Se o número de conídios é um fator chave no desempenho do teste, será difícil calcular, a partir da turbidez da solução, a concentração exata das hifas fúngicas, esporos, ou outros elementos.

A preparação das suspensões de hifas pode levar a suspensões inadequadas de inóculo. Entretanto, a densidade do inóculo deve ser verificada mediante contagem das colônias.

9. Alguns conídios de crescimento lento também podem trazer problemas para se chegar o ponto de corte dos testes. É possível estender o período de incubação em alguma circunstância? Os isolados de fungos de pacientes tratados com agentes antifúngicos podem parecer inibidos no método do teste. Portanto, mais dados são necessários para avaliar os resultados dos testes.

Não há estudos colaborativos sobre essa questão. Um período mais longo de incubação pode ser necessário para tais fungos, a fim de induzir crescimento suficiente para a determinação das MICs.

10. O período de incubação varia conforme a espécie de fungo envolvida; contudo, os organismos de crescimento mais lento podem exigir incubação superior a 96 horas. Nesses casos, se poços de microdiluição forem usados, existe o perigo de os poços secarem durante a incubação. Resultados precoces podem produzir falsos valores.

A Seção 3.8 descreve uma modificação da macrodiluição, que poderia ser mais apropriada para tais isolados.

11. A leitura dos resultados é realizada pelo método do escore numérico, que varia de zero a quatro. O único valor que parece desejável nessa variação do escore é entre zero e um. Esse método de determinar o ponto final é muito subjetivo.

A Seção 3.6 descreve o critério convencional de leitura das CIMs de itraconazol, da anfotericina B e dos três novos triazólicos: 100% de inibição ou o primeiro poço opticamente claro. Esse critério facilitaria a determinação do ponto final.

12. Quando estiverem disponíveis dados indicando a correlação entre a CIM e o resultado do tratamento, será possível fornecer informações acerca do êxito, ou fracasso, do teste.

Há estudos em andamento nesse sentido.

13. Tem sido sugerido modificar a cor no método de diluição em caldo. Percebeu-se que durante o teste de diluição em caldo de levedura, contra um agente antifúngico, o corante usado para contraste fornecia tonalidades que confundiam o leitor na definição de positivo ou negativo. Portanto, é preciso muito cuidado ao se acrescentar corante para melhor a clareza visual. São necessários mais dados sobre essa questão.

O teste de determinação da CIM baseia-se na inibição do crescimento ou turbidez, ao invés de mudança no pH.

14. A metodologia do teste de sensibilidade a agentes antifúngicos deve permanecer sob o controle dos laboratórios de referência até haver dados suficientes para definir a credibilidade desse importante teste. Entretanto, deve se permitir que outros laboratórios capacitados realizem testes de sensibilidade a agentes antifúngicos. Isso daria oportunidade para que os diferentes laboratórios compartilhassem os resultados entre si, e abriria as portas à permuta de um volume suficiente de dados para análise.

A decisão de realizar testes de sensibilidade a agentes antifúngicos cabe a cada instituição/organização.

Seção 2.3.2

15. Um filtro de 0.22µm seria apropriado?

O subcomitê concorda que não é necessário ser tão específico.

Seção 2.5.2

16. Por favor incluam as diretrizes para "razoável." Também seria útil focalizar as seguintes questões para ajudar a justificar as despesas de "elevar" esse tipo de testes...(1) para manter a proficiência é necessário [realizar] um número mínimo de testes por semana ou mês, (2) a frequência mínima para testes de maneira a assegurar um tempo de retorno clinicamente relevante e (3) o nível em que se precisa de pessoal "dedicado", em contraste como capacitar "todos."

As duas primeiras questões foram discutidas na Seção 4 do documento e a última deve ser decidida por cada instituição/organização.

Seção 3.1.1

17. Pode-se usar o Meio Antibiótico número 3 para testar anfotericina B?

O meio padrão RPMI-1640 é apropriado para testes de anfotericina B contra os fungos filamentosos.

Seção 3.2

18. Seria apropriado inserir uma frase reconhecendo que os isolados de *Aspergillus fumigatus* de baixa ou nenhuma esporulação, adaptados ao hospedeiro, não podem ser usados para preparar o inóculo desta maneira.

Essa questão já foi tratada. (Ver o Comentário 9.)

19. Vocês especificam o RPMI-1640. Eu acho que vocês só deveriam fazer referência a meio de incubação (Seção 3.1.1).

O RPMI-1640 é o meio de teste.

Seção 3.3

20. O ágar Sabouraud-dextrose “modificado” significa a modificação de Emmons?

O termo "modificado" foi eliminado.

21. É necessário usar as culturas de sete dias para organismos de crescimento rápido como *Rhizopus* e *Aspergillus*?

O subcomitê acredita que é necessário para fins de padronização.

22. Recomenda-se fazer contagem de colônias em cada teste?

As contagens de colônias validam o tamanho do inóculo; a freqüência desse procedimento deve ser uma decisão individual.

Seção 3.4

23. A Seção 3.4 refere-se à Seção 3.2.2 e não há Seção 3.2.2.

Isso já foi corrigido.

Seção 3.5

24. Em relação à questão geral de "a maioria dos outros fungos filamentosos oportunistas": Uma vez que os dados coletados focalizaram principalmente os cinco organismos/grupos de organismos relacionados na página 1, que critérios serão usados para estabelecer os tempos de incubação e/ou outras questões técnicas relativas a testes de patógenos oportunistas menos freqüentemente isolados?

Já há dados acerca de outras espécies de fungos moniliaceous e dematiaceous e, dentre esses patógenos mais comuns, apenas *Cladophialophora bantiana* e *P. lilacinus* requerem mais de 48 horas de incubação (72 horas) (Ver a referência 5).

25. Uma vez que alguns fungos filamentosos crescem mais devagar em temperaturas mais altas (35° C), será sempre apropriado realizar testes de sensibilidade nessa temperatura aquém de ótima?

Muitos poucos isolados de fungos patogênicos deixam de crescer a 35° C, e esses podem ser testados a 30° C.

26. Incubação por 72 horas é suficiente para *P. boydii*?

A maioria dos isolados de *P. boydii* produz crescimento suficiente para a determinação da CIM após 72 horas.

Seção 3.8

27. Em geral, a macrodiluição é o padrão, sendo a microdiluição uma modificação. A microdiluição deve ser usada para os organismos dimórficos e aqueles que crescem mais lentamente, que podem precisar de mais de 72 horas de incubação.

Ambos os métodos encontram-se descritos nas seções 3.2 e 3.8 do documento.

28. Poderia esclarecer qual é a frequência dos testes de CQ?

Pelo menos uma cepa de CQ deve ser incluída toda vez que se executam testes.

Apêndice A

29. Seria apropriado mencionar o tamanho do filtro?

O subcomitê acredita que não é necessário ser tão específico.

Tabelas 2 e 3

30. As colunas finais dessas tabelas trabalham com “Concentrações Finais” 5x ou 50x. Por que não mostrar concentrações 2x ou 20x, que são mais relevantes para montar a mistura final 1:1 da droga e o organismo numa bandeja de microdiluição?

As colunas mostram as concentrações 2x necessárias para os testes de microdiluição.

Resumo dos Comentários dos Delegados e das Respostas do Subcomitê

M38-A: *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinar a Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada*

Geral

1. Por que se usa o teste de diluição em tubo e não o "Etest"?

Uma vez que o Etest é um sistema comercial, não podemos fazer recomendações para testar com esse método.

Resumo

2. Em relação a *Rhizopus arrhizus*, por que se usa o nome da espécie? A maioria dos laboratórios não realiza identificações em nível de espécie. Pode-se usar essas normas para qualquer isolado de *Rhizopus*? Além disso, por que não fazer referência a *Scedosporium* ao invés de *Pseudallescheria*, uma vez que a maioria dos laboratórios recupera a forma anamórfica?

Essa norma se aplica a qualquer espécie de *Rhizopus*, contando que tenha esporangiosporos do mesmo tamanho. Conforme sugerido, fez referência a *Scedosporium* no Resumo, junto com *Pseudallescheria*.

Seção 2.2

3. Parece-me estranha essa cifra exata de 182,6mg para retirar além do necessário. Por que não arredondar para 182 ou 180?

Esse é apenas um exemplo, e assim foi declarado.

Seção 3.3

4. Em relação à preparação do inóculo, eu tenho dificuldade para criar um inóculo padrão a partir de isolados clínicos cepa a cepa. Não se deveria incluir instruções sobre como fazer um exame microscópico para se certificar de que a turbidez da densidade óptica (DO) realmente representa esporos? Até que ponto a DO está sempre relacionada com as concentrações de esporos?

O procedimento de quantificação do inóculo a que se faz referência nesta seção é a melhor maneira de checar a DO contra a UFC/mL. Acrescentaram-se referências adicionais aos dados dos estudos que demonstram o uso da DO com 90% dos inóculos dentro da faixa esperada de UFC/mL.

Seção 3.6

5. É necessário preparar um monte úmido e depois examiná-lo ao microscópio para se certificar de que a avaliação visual de "leve" e "proeminente" se deve a granulação?

A densidade do inóculo deve ser verificada conforme explicado na Seção 3.3.

Seção 3.7.1

Exige-se que os laboratórios realizem a identificação exata da espécie (ex., *A. terreus*, *Acremonium strictum*) e limitem os testes de sensibilidade a agentes antifúngicos a essa espécie?

Em alguns casos (e.x., sítios corpóreos estéreis) é necessário identificar a espécie em questão para determinar se trata de um isolado de patógeno significativo.

Seção 4.3

7. Existem recomendações sobre as cepas ATCC de referência para fungos?

As recomendações sobre as cepas ATCC de referência para fungos são apresentadas na Tabela 4.

Seção 4.8.3

Em relação à "interpretação do ponto de corte," há fotografias disponíveis que mostrem as várias reações, 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 (CIMs) contra bactérias aeróbicas mediante macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo 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 (CIMs) contra bactérias anaeróbicas mediante macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo 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 apropriadas 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.
- M27-A2** **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard (2002).** Este documento trata da seleção e preparação de agentes antifúngicos, da implementação e interpretação dos testes e dos requisitos de controle de qualidade relativos aos testes de sensibilidade das leveduras que causam infecções fúngicas invasivas.
- M29-A2** **Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Este documento fornece orientação relativa ao risco 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.

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

NOTES

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 1-56238-470-8

