

BrCAST
Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing



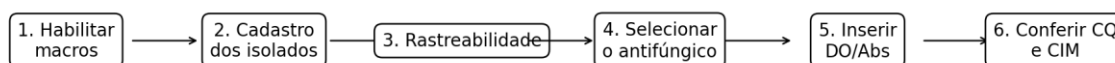
EUCAST

European Committee
on Antimicrobial
Susceptibility Testing

TUTORIAL DE UTILIZAÇÃO

Planilha para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antifúngicos

Guia prático passo a passo para uso da planilha-base para determinação de CIM baseada em documentos do BrCAST



Elaboração: Fábio S. Ferreira, MSc
Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz – LACEN/BA
Membro do Comitê de Antifúngicos do BrCAST

Salvador – BA
2026

SUMÁRIO

1. Finalidade deste tutorial
2. Antes de começar
3. Visão geral da planilha
4. Aba Iniciar
5. Aba Cadastro
6. Aba Rastreabilidade
7. Aba Resultados
8. Aba de antifúngico – exemplo com Fluconazol
9. Como ler o resultado da CIM
10. Controle de qualidade e mensagens de atenção
11. Fluxo recomendado de trabalho
12. Erros comuns e como evitá-los
13. *Checklist* antes de encerrar o ensaio

1 FINALIDADE DESTE TUTORIAL

Este documento foi elaborado para orientar o uso da planilha do Excel voltada à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microliluição em caldo, com base nos documentos oficiais do BrCAST. O objetivo é permitir que profissionais familiarizados com o ensaio de microdiluição em caldo utilizem a planilha de forma padronizada.

Importante: a planilha é uma ferramenta de apoio ao cálculo e à organização do ensaio. Ela não substitui a execução correta do método, a avaliação do controle de qualidade nem o julgamento técnico do profissional responsável.

O tutorial descreve as abas principais e, para evitar repetição, utiliza a aba Fluconazol como modelo para explicar o funcionamento das planilhas dos antifúngicos. As demais abas seguem a mesma lógica geral, preservando as particularidades de cálculo já incorporadas a cada fármaco.

2 ANTES DE COMEÇAR

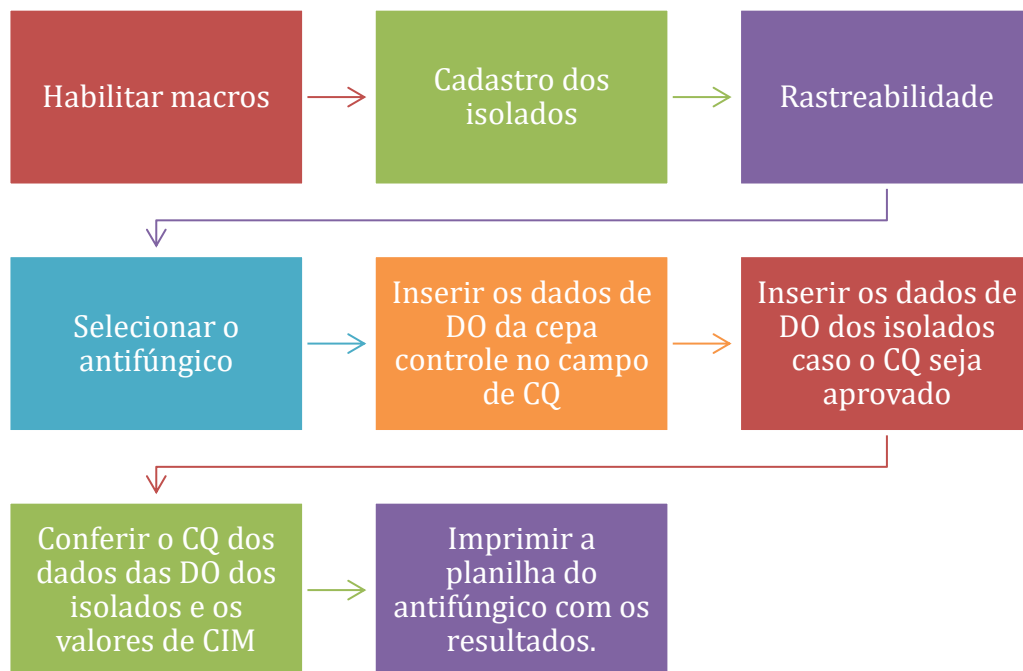
- Será necessária a instalação de um arquivo de fonte TrueType (.ttf) de código de barras, denominado “**IDAutomationHC39M Code 39 Barcode**”. O arquivo é fornecido junto com o arquivo da planilha, mas pode ser feito o download em qualquer site de arquivos de fontes *True Type*.
- Utilize somente a versão da planilha fornecida pelo responsável pelo projeto. Evite cópias antigas ou arquivos modificados localmente.
- Abra o arquivo preferencialmente no Microsoft Excel no computador. A versão original utiliza macros para navegação e automação.
- Se o Excel exibir um aviso de segurança, habilite as macros e permita o conteúdo somente quando o arquivo tiver sido recebido de uma fonte confiável.
- Não apague fórmulas, não arraste células calculadas nem altere a estrutura das abas.
- Tenha em mãos as leituras de absorbância/DO da placa, a identificação dos isolados, os dados do controle de qualidade, os lotes e as informações de rastreabilidade.

Regra prática: digite apenas nos campos destinados à entrada de dados. Células que apresentam resultados automáticos devem ser preservadas.

3 VISÃO GERAL DA PLANILHA

Aba	Função	Quando utilizar
Iniciar	Menu principal e acesso às etapas do arquivo.	No início e para navegar entre as áreas.
Cadastro	Identificação do protocolo, dos isolados e da cepa de controle.	Antes de lançar resultados.
Rastreabilidade	Registro de equipamentos, insumos, lotes, responsáveis e datas.	Durante a documentação do ensaio.
Resultados	Menu de acesso às planilhas dos antifúngicos.	Após cadastro/rastreabilidade.
Abas dos antifúngicos	Entrada das leituras, Controle de Qualidade (CQ), cálculos e determinação da CIM.	Para cada fármaco testado.

Figura 1 – fluxo de atividades a serem feitas na planilha



4 ABA INICIAR

A aba Iniciar funciona como a porta de entrada da planilha (Figura 2). Nela estão os botões de navegação para Cadastro de amostras, Rastreabilidade de insumos e equipamentos e Entrada de resultados.



Figura 2 – Tela inicial da planilha com os menus de navegação.

Passo a passo:

- Abra o arquivo e confirme que o conteúdo e as macros estão habilitados, quando aplicável.
- Selecione Cadastro de amostras para iniciar a identificação do ensaio.
- Após o cadastro, utilize o botão de Rastreabilidade para registrar os elementos do processo.
- Em seguida, acesse Entrada de resultados para escolher o antifúngico a ser analisado.

Se os botões não responderem, confirme se o arquivo foi aberto no Excel para computador e se as macros foram habilitadas. Ainda é possível navegar pelas guias inferiores, mas a experiência de uso será menos direta.

5 ABA CADASTRO

A aba Cadastro centraliza a identificação do ensaio (Figura 3). Os dados preenchidos aqui são reutilizados automaticamente nas abas dos antifúngicos, reduzindo a necessidade de redigitação.

Cadastro de isolados para testagem		BrCAST Brasília Comitê de Antimicrobiano Susceptibilidade Teste	
Nº Protocolo			
Identificação		Cepa Controle	
Isolado 1 (A)		Tipo:	
Isolado 2 (B)		Nº:	
Isolado 3 (C)		Lote:	
Isolado 4 (D)		Validade:	
Isolado 5 (E)		Menu Iniciar Rastreabilidade	
Isolado 6 (F)			
Isolado 7 (G)			

Figura 3 – Tela inicial da planilha com os menus de navegação.

5.1 Protocolo

Preencha o número de protocolo do ensaio no campo correspondente. Esse identificador é encaminhado para a aba de rastreabilidade.

5.2 Isolados

A planilha permite cadastrar até sete isolados, identificados como Isolado 1 (A) a Isolado 7 (G). Preencha o número interno ou de identificação utilizado pelo laboratório nos campos de cada isolado.

5.3 Cepa de controle

Na área Cepa Controle, registre a cepa utilizada e os dados disponíveis no formulário, como tipo (ATCC, NCTC, INCQS, outros), número, lote e validade. O identificador da cepa de controle também é levado às abas dos antifúngicos.

Evite dados pessoais: para o compartilhamento de arquivos de validação ou de colaboração, utilize códigos laboratoriais/desidentificados e não inclua identificadores diretos de pacientes.

6 ABA RASTREABILIDADE

A aba Rastreabilidade (Figura 4) documenta os principais elementos associados ao ensaio. Seu preenchimento é importante para reconstruir, posteriormente, como o teste foi executado.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Formulário para rastreabilidade de ensaio de determinação de CIM

Menu Iniciar Cadastro Nº Protocolo: _____

Equipamentos

Item	ID/TAG
CSB	
Leitor de placa	
Estufa	
Micropipeta 1	
Micropipeta 2	
Micropipeta 3	

Meios e Insumos

Item	Lote
Salina 0,85%	
RPMI 1640	

Antifúngicos

Item	Lote
Anfotericina B	
Anidulafungina	
Fluconazol	
Isavuconazol	
Itraconazol	
Micafungina	
Posaconazol	
Voriconazol	

Processos

Item	Responsável	Data
Pipetagem		
Leitura de placa		
Avaliação dos resultados		

ID Pacientes / Isolados

- Isolado 1
- Isolado 2
- Isolado 3
- Isolado 4
- Isolado 5
- Isolado 6
- Isolado 7

Figura 4 – Tela inicial da planilha com os menus de navegação.

Bloco	Exemplos	O que registrar
Equipamentos	CSB, leitor de placa, estufa, micropipetas	ID/TAG ou identificação interna.
Meios e insumos	Salina 0,85%, RPMI 1640	Lote utilizado.
Antifúngicos	Anfotericina B, anidulafungina, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, micafungina, posaconazol e voriconazol	Lote do material utilizado.
Processos	Pipetagem, leitura da placa, avaliação dos resultados	Responsável e data.

Os identificadores dos isolados cadastrados são exibidos automaticamente na lateral da planilha de rastreabilidade.

7 ABA RESULTADOS

A aba Resultados (Figura 5) funciona como um menu de acesso às planilhas específicas dos antifúngicos. Após concluir Cadastro e Rastreabilidade, selecione o fármaco correspondente ao ensaio.

A versão-base contém abas para fluconazol, voriconazol, micafungina, isavuconazol, anidulafungina, anfotericina B, posaconazol e itraconazol.

Atenção: não use a regra visual de um antifúngico para recalcular manualmente outro. Cada aba contém as fórmulas e as particularidades previstas para aquele fármaco.



Figura 5 – Tela inicial da planilha com os menus de navegação.

8 ABA DE ANTIFÚNGICO – EXEMPLO COM FLUCONAZOL

A aba Fluconazol será usada como exemplo. O fluxo geral é o mesmo nas demais planilhas: validar o controle de qualidade, definir a maior CIM testada, inserir as absorbâncias, conferir os controles e observar a matriz final de determinação da CIM.

8.1 Etapa 1 – Controle de qualidade

Na parte superior da aba há o bloco Controle Qualidade – Validação do ensaio (Figura 6). Para cada cepa de referência disponível, a planilha apresenta o valor-alvo e o intervalo de aceitação, e possui um campo para o lançamento da CIM observada no ensaio.

- Digite a CIM obtida para a cepa de CQ no campo de entrada correspondente.
- Observe a resposta automática da planilha: Aceitável ou Rever (Figura 7).
- Se o CQ exigir revisão, não avance com a liberação dos resultados sem investigar a causa.

Controle de Qualidade - Validação do ensaio								Data
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. albicans</i> CNM-CL F8555		<i>C. krusei</i> CNM-CL 3403		
Alvo	1	Alvo	32	Alvo	64	Alvo	32	Analista
Intervalo	0,5 - 2	Intervalo	16 - 64	Intervalo	32 - 128	Intervalo	16 - 64	

Figura 6 – Região da planilha de resultados onde é feito o controle de qualidade do ensaio.

<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019			<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		
Alvo	1		Alvo	1	
Intervalo	0,5 - 2		Intervalo	0,5 - 2	
0,5	Aceitável	✓	4	Rever	✗

Figura 7 – Avaliação automática do CQ da cepa controle.

Versão normativa: os valores de CQ podem ser atualizados pelo BrCAST/EUCAST ao longo do tempo. Utilize sempre a versão da planilha distribuída pelo responsável e confira a documentação normativa vigente do seu laboratório.

8.2 Etapa 2 – Informar a maior CIM testada

No campo Maior CIM testada, informe a maior concentração do fármaco utilizada nesse ensaio. A planilha gera automaticamente a sequência de concentrações em diluição seriada 1:2 nas colunas seguintes.

Exemplo conceitual: se a maior concentração for 64 mg/L, a sequência será 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 mg/L, conforme a configuração da planilha (Figura 8).

Valores de absorbância (Abs): Insira os valores de Abs conforme posição na placa.											Maior CIM testada	
CN											CP	Nº Interno

↓

Valores de absorbância (Abs): Insira os valores de Abs conforme posição na placa.											Maior CIM testada	64
CN	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CP	Nº Interno

Figura 8 – Esquema do autopreenchimento das concentrações de trabalho. Deverá ser inserida no campo circulado a maior concentração do ensaio em curso.

8.3 Etapa 3 – Inserir as absorbâncias

A área Valores de absorbância (Abs) deve ser preenchida conforme a posição correspondente na placa (Figura 9). Cada linha representa um isolado cadastrado ou a cepa de controle; as colunas representam controle negativo, concentrações do fármaco, controle positivo e identificação interna.

CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CP	Nº Interno
												ISOLADO 1
												ISOLADO 2
												ISOLADO 3
												ISOLADO 4
												ISOLADO 5
												ISOLADO 6
												Cepa Controle

CN – Controle negativo | C1 – C10 – concentrações seriadas | CP – Controle positivo

Figura 9 – Esquema da área de digitação das DO dos isolados frente ao fármaco testado.

- CN: lance a leitura do controle negativo correspondente.
- C1 a C10: lance as leituras dos poços contendo as concentrações seriadas do antifúngico, mantendo exatamente a ordem da placa.
- CP: lance a leitura do controle positivo de crescimento.
- Nº interno: é preenchido automaticamente a partir do Cadastro quando o arquivo estiver corretamente configurado.

Ponto crítico: a troca da ordem das concentrações ou a transposição de uma leitura para outra coluna altera a determinação da CIM. Confira a placa antes de finalizar a digitação.

8.4 Etapa 4 – Conferir a média do controle negativo

A planilha calcula automaticamente a média aritmética dos controles negativos ($\bar{x}_{CN}$). Em seguida, utiliza esse valor para corrigir as absorbâncias dos poços.

Conceitualmente, a correção realizada é: absorbância corrigida = absorbância do poço – média do controle negativo. O usuário não deve digitar manualmente nos campos de absorbância corrigida.

8.5 Etapa 5 – Conferir o controle positivo

O controle positivo corrigido é utilizado para avaliar o crescimento e estabelecer o limiar de inibição do fármaco. Na planilha de fluconazol, o ponto final é baseado na redução de 50% em relação ao controle positivo corrigido.

A própria planilha orienta que, se o controle positivo apresentar absorvância corrigida inferior a 0,200 após a leitura inicial, a placa deve ser reavaliada conforme o procedimento metodológico aplicável. Não force um resultado numérico quando o crescimento do controle for insuficiente.

8.6 Etapa 6 – Não editar os cálculos intermediários

As áreas Absorvância corrigida e Cálculo do valor de inibição são campos automáticos. Elas existem para tornar o cálculo rastreável e permitir conferência, mas não devem ser preenchidas ou alteradas pelo usuário.

8.7 Etapa 7 – Matriz final de determinação

Na seção Definição dos valores de concentração inibitória mínima, a planilha compara a absorvância corrigida de cada concentração ao limiar calculado (Figura 10).

- Quando aparece "--", o crescimento permanece acima do critério de inibição definido para aquela aba.
- Quando o valor numérico da concentração é apresentado, o critério de inibição é atingido.
- A CIM corresponde à menor concentração que atende ao critério de *endpoint*, considerando a sequência de diluições e a validade do ensaio.

Valores de absorvância (Abs): Insira os valores de Abs conforme posição na placa.										Maior CIM testada	64	
CN	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CP	Nº Interno
0,212	0,220	0,225	0,227	0,226	0,275	0,357	0,561	0,680	0,710	0,752	1,167	296000001

Absorvância corrigida: (Abs do poço - $\bar{x}$ CN)											
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CP	Nº Interno
0,008	0,013	0,015	0,014	0,063	0,145	0,349	0,468	0,498	0,540	✓ 0,955	296000001

Definição dos valores de concentração inibitória mínima, onde se representado por "--" indica crescimento maior que 50% e, se igual ao valor numérico, representa um crescimento menor ou igual a 50%.

64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	Nº Interno
64	32	16	8	4	2	1	0,5	--	--	296000001

Figura 10 – Dados de densidade óptica (DO) lançados; a planilha realiza automaticamente a checagem dos dados e informa o valor da CIM, que, neste caso, é de 0,5 mg/L.

9 COMO LER O RESULTADO DA CIM

Leia a linha correspondente ao isolado da maior para a menor concentração. A CIM é a menor concentração em que o critério de inibição permanece atendido. Não transforme o resultado em um número intermediário entre duas diluições: a CIM pertence à série discreta testada.

Exemplo: se 2 mg/L atende ao *endpoint* e 1 mg/L não atende, a CIM é de 2 mg/L. Valores como 1,3 ou 1,7 mg/L não fazem parte da série de diluição e não devem ser inferidos.

10 CONTROLE DE QUALIDADE E MENSAGENS DE ATENÇÃO

Situação	Conduta prática
CQ = “Aceitável”	Prosseguir, desde que os demais critérios do ensaio estejam adequados.
CQ = “Rever”	Investigar o controle, a concentração, o preparo, a leitura, o lote e as demais condições antes de aceitar o ensaio.
CP corrigido insuficiente	Não interpretar automaticamente; seguir a orientação metodológica para reincubação/repetição.
Campo vazio	Verificar se o dado realmente não se aplica ou se houve omissão na digitação.
Padrão visual inesperado entre diluições	Rever dados brutos, posição dos poços e possíveis erros de pipetagem/leitura.

11 FLUXO RECOMENDADO DE TRABALHO

1. Abrir a planilha e habilitar macros quando o arquivo for confiável.
2. Preencher o Cadastro.
3. Completar a Rastreabilidade.
4. Acessar Resultados e selecionar o antifúngico.
5. Preencher o bloco de CQ.
6. Informar a maior CIM testada.
7. Digitar as absorbâncias exatamente conforme a placa.
8. Conferir CN, CP e cálculos automáticos.
9. Determinar/confirmar a CIM na matriz final.
10. Registrar qualquer ocorrência atípica e revisar o ensaio antes de utilizar o resultado.

12 ERROS COMUNS E COMO EVITÁ-LOS

Digitar nas células calculadas: Preencha somente os campos de entrada; não sobrescreva as fórmulas.

Inverter concentrações: Confira a maior CIM e a ordem 1:2 antes de lançar a placa.

Trocar linhas entre isolados: Compare o número interno exibido na aba com o número do cadastro.

Ignorar o CQ: Um resultado isolado não deve ser avaliado em isolamento da validade do ensaio.

Usar cópia antiga: Trabalhe somente com a versão distribuída pelo responsável.

Copiar/colar blocos inteiros: Prefira digitar ou colar apenas valores nas áreas destinadas à entrada, evitando copiar fórmulas ou formatação.

Inferir o valor entre diluições: reporte a concentração correspondente à série efetivamente testada.

13 CHECKLIST ANTES DE ENCERRAR O ENSAIO

- ☐ Protocolo preenchido.
- ☐ Isolados identificados corretamente.
- ☐ Cepa de CQ identificada.
- ☐ Equipamentos e lotes registrados.
- ☐ Antifúngico/lote registrado.
- ☐ Maior CIM testada correta.
- ☐ Absorbâncias conferidas com a placa.
- ☐ CQ avaliado.
- ☐ CP adequado ou ocorrência documentada.
- ☐ CIM conferida na série de diluição.
- ☐ Arquivo salvo com identificação que permita rastreabilidade.

Este tutorial descreve o funcionamento operacional da planilha e não substitui os documentos metodológicos e normativos adotados pelo laboratório.

ANEXO – MAPA RÁPIDO DAS ABAS

Se você precisa...	Vá para...
Iniciar o fluxo	Iniciar
Identificar amostras/isolados	Cadastro
Registrar lotes e equipamentos	Rastreabilidade
Escolher o fármaco	Resultados
Lançar DO/Abs e obter CIM	Aba do antifúngico correspondente
Voltar ao menu	Botão Menu Iniciar ou guia Iniciar