

## O ANTIBIOGRAMA

Newton Neves da Silva \*

### SINOPSE

Descreve-se a técnica para execução e interpretação de um antibiograma empregando-se o método das placas e discos de alta concentração.

Os trabalhos de Florey e cols. (5) — os introdutores dos antibióticos em terapêutica humana — já mostravam ser possível a determinação «in vitro» da suscetibilidade de um microorganismo à penicilina mediante diluições seriadas desse então, novo agente terapêutico. Com o surgimento de novos antibióticos colocados à disposição da classe médica pela indústria farmacêutica, somado à frequência cada vez maior de raças que a eles se tornavam resistentes — especialmente os bacilos gram-negativos — a Medicina moderna se apoia cada vez mais nos resultados de uma comprovação de sensibilidades (antibiograma) para a escolha adequada do agente terapêutico.

Vários métodos, com inumeráveis modificações, estão em uso atualmente. É evidente que não podem ser de igual mérito. Seria desejável que um método selecionado por uma comissão de técnicos fôsse estandarizado

internacionalmente, tarefa que foi tentada pela OMS em 1961 (8). Uma uniformização dos métodos teria, entre outras vantagens, a de permitir uma comparação dos resultados obtidos em diferentes áreas.

Não é objeto deste trabalho fazer um estudo crítico de cada um dos métodos utilizados atualmente. Vamos limitar nossa exposição aos dois métodos principais: ao método das diluições em tubo e ao método da difusão em agar com discos impregnados com antibióticos.

### I — Método das diluições em tubo

Basicamente, o método das diluições seriadas, em tubos, consiste em colocar quantidades determinadas do antibiótico em tubos contendo 10 ml do meio de cultura escolhido e adicionar, a cada tubo, uma gota de uma diluição a 1/10 de uma cultura, de 24 horas, do microorganismo. É evidente que o caldo de cultura escolhido deve permitir um crescimento da bactéria a ser testada. Depois de incubação a 37°C durante 18 horas, verifica-se que quantidade de antibiótico foi necessária para inibir o crescimento do germe em teste.

\* Diretor do Instituto de Pesquisas Biológicas.

## Exemplo de um teste com Penicilina:

| N.º do tubo | Unidades de Penicilina por ml de meio de cultura | Crescimento da bactéria |
|-------------|--------------------------------------------------|-------------------------|
| 1           | 0,25                                             | +                       |
| 2           | 0,50                                             | +                       |
| 3           | 0,75                                             | +                       |
| 4           | 1                                                | +                       |
| 5           | 2                                                | —                       |
| 6           | 5                                                | —                       |
| 7           | 18                                               | —                       |
| 8           | 20                                               | —                       |
| 9           | 50                                               | —                       |
| 10          | —                                                | +                       |

No exemplo acima foram necessárias duas unidades de Penicilina por ml para inibir o crescimento do germe. Admite-se que no sangue e outros humores a mesma coisa aconteça.

O teste das diluições seriadas presta-se para as seguintes considerações:

1) — Vantagens — fornece resultados quantitativos, isto é, ele nos diz a quantidade exata de antibiótico que é capaz de inibir o crescimento da bactéria.

2) — Desvantagens — é exaustivo e dispendioso. Para se praticar um teste com 10 antibióticos consome-se 100 tubos de meio de cultura e gasta-se cerca de uma hora de trabalho. Além disso, exige o isolamento prévio da bactéria, em cultura pura.

Em virtude das considerações acima, o método das diluições seriadas em tubos não é usado na rotina dos laboratórios. Ele fica reservado para casos muito especiais: em trabalhos de pesquisa ou quando um resultado quantitativo é de interesse clínico, como acontece em hemoculturas; em pacientes que não respondem à terapêutica adequada estabelecida ou em pacientes que apresentam recaída em pleno uso de antibióticos.

## II — Método dos discos em placas

Neste método, discos de papel de filtro impregnados com antibióticos são colocados em placas semeadas com o germe em teste. Depois de uma permanência na estufa, anota-

se o diâmetro da zona de inibição formada em torno de cada disco.

Em virtude de sua simplicidade, facilidade de execução e de sua reprodutibilidade, é o método de escolha para os laboratórios de patologia clínica e, por isso, vamos dar aqui detalhes mais precisos sobre a sua execução e interpretação.

Este método foi proposto por Bondi e cols. em 1947 (4). Durante muitos anos seguiram-se os pontos básicos estabelecidos, em especial o uso de discos de baixa concentração de antibióticos. Últimamente porém, graças aos trabalhos de Bauer e cols. (3), prefere-se o emprego de discos de elevada concentração de antibióticos que fornecem maiores halos de inibição e permitem outra interpretação, qual seja o estabelecimento de diâmetros de inibição indicadores de resistência e de suscetibilidades.

Alguns autores insistem no emprego de discos com três concentrações de antibióticos — baixa, média e elevada. Entretanto, hoje, a grande maioria dos técnicos de laboratórios preferem o emprego de discos de concentração única, como vimos empregando há muitos anos.

Tal como acontece no método das diluições, também aqui vários fatores são capazes de interferir em seus resultados.

#### 1) — Composição do meio de cultura

A composição do meio de cultura básico (gelose nutritiva) tem pouco efeito nos resultados dos testes. A adição de soro diminui, acentuadamente, a atividade de alguns antibió-

ticos, de modo especial a novobiocina. A presença de eletrólitos reduz a atividade da estreptomina.

#### 2) — Tamanho do inóculo

O tamanho do inóculo afeta os diferentes antibióticos em diversos graus, sendo a penicilina a mais atingida. Usando como inóculo uma cultura de *Staphylococcus aureus*, Garrod (2) observou que o diâmetro da zona de inibição era de 5mm com uma concentração de 300 milhões por ml e de 17mm com 300 germes por ml. O tamanho do inóculo é crítico nas provas com as sulfas em meio líquido, no método das diluições, pois uma concentração adequada de um microorganismo altamente sensível é capaz de deixar de inibir o crescimento de uma determinada bactéria, quando o inóculo for muito grande. Se diluirmos uma cultura em caldo de 24 horas de *Staph. aureus* de maneira a contar com uma concentração de 0,5 bilhão por ml e a testarmos frente à penicilina, os resultados serão os seguintes: com a cultura diluída a 1:2 o halo de inibição será de 35,9 mm, enquanto que com a mesma cultura diluída a 1:60 o halo será de 41,0mm.

#### 3 — pH do meio de cultura

Para certos antibióticos o pH do meio de cultura, especialmente nos meios líquidos, é de capital importância, pois o grau de inibição varia conforme o pH.

Assim, num pH de 8,5 a Estrepto-

micina é 512 vezes mais ativa que em um pH de 5,5. Da mesma forma a Neomicina e a Kanamicina são, respectivamente, mais ativas 64 e 16 vezes. De outra forma as tetraciclina são mais ativas no meio ácido.

#### 4) — Como praticar o teste de sensibilidade

##### a) — meio de cultura

Em nossos trabalhos empregamos o meio básico (gelose nutritiva) com a seguinte composição:

|                                         |            |
|-----------------------------------------|------------|
| Extrato de carne .....                  | 3,0 g      |
| Cloreto de sódio .....                  | 5,0 g      |
| Peptona bacteriológica<br>(Geyer) ..... | 15,0 g     |
| ou                                      |            |
| Bacto-peptona Difco ...                 | 15,0 g     |
| Água destilada .....                    | 1.000,0 ml |

Acertar o pH a 7,2

Distribuição em frascos — 100 ml por frasco — e esterilização em autoclave durante 20 minutos a 120°C. Quando é necessário agar-sangue, juntamos 5% de sangue humano. O sangue é coletado, diariamente, da seguinte maneira: em tubos contendo 2 ml de citrato de sódio a 2%, esterilizados juntam-se 8 ml de sangue. O sangue utilizado é proveniente de qualquer pessoa que não esteja tomando antibióticos. Pode-se usar, também, sangue de Banco de Sangue com data de aplicação expirada ou sangue de coelho, cavalo ou carneiro, na mesma proporção.

Quando se trata de uma «Enterobacteriaceae», praticamos o teste de

sensibilidade no meio com eosina — azul de metileno (Teague), com a seguinte composição:

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Meio básico (gelose nutritiva) 100 ml |       |
| Lactose .....                         | 0,5 g |
| Sacarose .....                        | 0,5 g |
| Sol. de eosina amarela a 2.%          | 2 ml  |
| Sol. de azul de metileno a 0,5% ..... | 1 ml  |

Com o emprêgo dêste meio, consegue-se obter, numa mesma placa, o resultado do teste de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos e também, na maior parte das vezes, o reconhecimento do bacilo gram-negativo testado.

Uma variação acentuada na espessura do agar, induzirá uma variação no tamanho da zona de inibição. Assim, um mesmo germe, num mesmo meio, apresentará o seguinte diâmetro de inibição, conforme a quantidade de meio colocado na placa:

| Agar-sangue<br>(em ml) | Zona de Inibição<br>(em mm) |
|------------------------|-----------------------------|
| 5,5                    | 24,6                        |
| 7,5                    | 24,5                        |
| 9,5                    | 24,8                        |
| 15,0                   | 23,4                        |

Em nossos trabalhos usamos placas que contém 5 a 6 mm de espessura do meio de cultura.

##### b) — Preparação dos discos

Empregamos papel de filtro nº 3 e os discos são cortados ao diâmetro

de 6 mm. Cada disco absorve 0,004 ml. Com isto, é possível calcular a concentração de cada antibiótico na solução-mãe e, conseqüentemente, a quantidade retida em cada disco.

É conveniente que cada nova partida de discos seja testada frente a raças de microorganismos de sensibilidade conhecida.

A quantidade de antibiótico que deve conter cada disco depende da sua difusibilidade e da sua própria atividade.

Um ponto importante a respeito deste tópico é a conservação dos discos.

Griffith e Mullins (6) determinaram a influência da temperatura e da umidade para a conservação dos discos de antibióticos. Os mesmos lotes de discos foram colocados em temperaturas de — 20°, 40 a 60, 37° e 56°C e em três condições de umidade: sem dissecante, com dissecante e com alto teor de umidade. De suas experiências concluíram que a temperatura tem pouca influência, mas que a umidade parece ser de importância máxima na estabilidade dos discos de antibióticos.

Assim, os discos devem ser conservados num lugar frio e seco. O uso de campânulas com drierite ou cloreto de cálcio, a vácuo, no freezer, parece ser a condição ótima de conservação dos discos. A campânula deve ser removida do freezer cerca de 1 hora antes do uso para evitar a condensação de umidade no interior do frasco contendo os discos.

Na falta de vácuo, os discos podem ser conservados no refrigerador, em frascos bem fechados, contendo sílica gel com dissecante.

#### c) — Inóculo

Deve-se usar um inóculo tal que produza um crescimento denso, mas não totalmente confluyente. Assim não se deve usar como inóculo uma cultura de 24 horas, mas sim diluí-la pelo menos a 1/10 ou preferentemente, a uma densidade equivalente ao nº 2 do «standard» de sulfato de bário.

O inóculo não deverá ser passado na superfície do meio de cultura com bastões de algodão, pois, dessa maneira, fere-se o meio de cultura, o que atrapalha a leitura dos resultados. Colocamos cerca de 5 gotas na placa e inclinamo-la para os vários lados, de maneira que toda a superfície seja molhada. O excesso é retirado com uma pequena tira de papel de filtro. Secar na estufa durante 30 a 60 minutos. Só então colocar os discos, com pinça própria.

#### d) — Testes com sulfas

Qualquer meio pode ser usado desde que se tome as seguintes precauções:

1) O meio deve ser razoavelmente livre de inibidores das sulfas (as perptonas são as mais importantes). Isso pode ser alcançado ou usando meio isento de peptonas ou adicionando cerca de 5% de sangue lisado de cavalo.

2) o tamanho do inóculo deve ser controlado com o máximo rigor, pois, se for grande, a ação das sulfas, mesmo em elevada concentração, é totalmente inibida. Nesse caso, mesmo o germe altamente sensível vai aparecer como resistente.

Por diversas vezes fomos solicitados a praticar o teste de sensibilidade

de com os diferentes tipos de sulfas. Isso é inteiramente desnecessário. A propósito, Barber e Garrod (2) afirmam:

«Entre as sulfonamidas mais ativas interessa muito pouco qual é usada. Os resultados obtidos com uma, aplicam-se, com pouca diferença, à outra».

#### e) — Escolha de antibióticos

Não é necessário testar cada germe com todos os antibióticos existentes, como fazem alguns laboratórios. Por exemplo, frente a uma amostra de *E. coli* ou de *Klebsiella aerógenes* não é necessário usar a Penicilina G ou a Eritromicina.

Bailey e Scott (1) recomendam o seguinte critério:

Para bacilos gram-positivos: Penicilina G, Metecilina, Eritromicina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Kanamicina e ocasionalmente Sulfamethizol e Ampicilina.

Para bacilos gram-negativos: Cloranfenicol, Tetraciclina, Estreptomicina, Kanamicina, Polymixina B, Sulfamethizol, Ampicilina e Cefalotina. Para infecção urinária mais Nitrofurantoina e Ácido Nalidíxico.

#### f) — Leitura

Após um período de incubação de 18 horas, procede-se a medição do diâmetro da zona de inibição por intermédio de uma régua milimetrada.

Desde a introdução do método dos discos na rotina clínica observa-se, de vez em quando, um crescimento bacteriano mais intenso na linha que demarca a zona de inibição, isto é, no anel que limita a zona inibitória.

Pensou-se que esse anel de crescimento aumentado fôsse devido à es-

timulação do crescimento por doses sub-inibitórias do antibiótico.

Lorian e Strauss (7) procuraram determinar se o anel poderia ser reproduzido independentemente da presença de antibióticos. Assim, discos de papel encerado, estéril (25 mm de diâmetro), foram colocados em placas de agar-sangue. A seguir, com um nebulizador, semearam uma cultura de *Staph. aureus* de 24 horas, na superfície da placa. Depois de seca, colocaram noutra área da mesma placa discos com antibióticos (cefalotina, bacitracina, kanamicina e vancomicina). O disco de papel encerado foi retirado e a placa colocada na estufa a 37°C por 20 horas. Zonas isentas de crescimento foram observadas em torno dos discos dos antibióticos e em torno da área protegida pelo disco de papel encerado. Mas, todas as zonas estavam circundadas por um anel de crescimento bacteriano mais intenso do que aquele observado no resto da placa, o que demonstra que a presença do anel é independente da presença de antibiótico.

A mesma experiência, repetida com meio de cultura menos rico em substâncias nutritivas, mostrou tal anel reduzido ou ausente. Os trabalhos de Lorian e Strauss mostram, então, que a presença ou ausência de tais anéis depende da maior ou menor riqueza dos meios de cultura empregados.

#### g) — Testes em cultura primária

Em situações de emergência, tais como nos casos de líquido cefalorraquidiano ou amostras de urina que revelam a presença de um único mi-

croorganismo, pode-se usar o teste em cultura primária, isto é, semeadando o material diretamente na placa e colocando em seguida os discos antibióticos.

#### h) — Interpretação

A vantagem de discos de alta concentração é que facilitam a leitura, já que os diâmetros são bem maiores, de 15 a 30mm.

Em condições controladas, o método dos discos é capaz de produzir uma eficiência em torno de 96,25% (8). Os restantes 3,75% estariam incluídos na falha do método. Um maior cuidado na leitura e interpretação dos antibiogramas deve ser dado aos antibióticos suscetíveis, pois eles serão os escolhidos.

A suscetibilidade ou resistência revelada pelo método dos discos corresponde à resposta do microorganismo a uma determinada concentração do antibiótico no método da diluição em série, em caldo.

O quadro proposto por Bauer e cols.(3) e que a seguir reproduzimos é que nos serve de guia de leitura (Fig. 1).

Deve ser notado que a interpretação da zona de inibição é diferente para cada agente anti-microbiano, não somente porque varia a potência de cada disco, mas, também, porque a difusão e solubilidade de cada agente é diferente.

Obviamente o disco que produz a maior zona de inibição não é necessariamente o antibiótico de escolha para um dado microorganismo. Assim, se uma raça de *E.coli* mostra um diâmetro de inibição de 22mm

em torno da tetraciclina é de 30mm em torno do clorafenicol, o que pode ser dito ou concluído é que a raça de bactéria examinada é suscetível a ambas as substâncias.

Compete ao clínico selecionar, entre os suscetíveis, o mais apropriado para o tratamento de um caso particular, levando em consideração propriedades farmacológicas e toxicológicas e, principalmente, se é bacteriostático ou bactericida.

Uma palavra de alerta para a mandelamine: a ação inibidora deste agente quimioterápico se prende exclusivamente à liberação de formol na urina em meio ácido, pois em meio alcalino não há liberação da quele germicida e consequentemente, não inibe ou não mata os microorganismos. É relativamente comum nos testes de sensibilidade com *Proteus* observar-se enormes halos de inibição (até 40mm de diâmetro) em torno da mandelamine. Ora, sabendo-se que os *Proteus* produzem amônia que alcaliniza a urina, vamos ter o seguinte resultado: um teste in vitro mostrando enorme ação inibidora de uma raça de *Proteus*, enquanto que a resposta clínica é nula, em virtude da alcalinidade da urina determinada pelo próprio microorganismos.

Na interpretação de um antibiograma a primeira coisa que se deverá levar em conta é saber se o germe que foi isolado e testado é o responsável pelo quadro clínico. Em muitos casos, por exemplo, quando se isola o microorganismo de uma lesão fechada (furúnculo) ou quando se trata de uma infecção urinária por *E.coli* não há dúvida em con-

Fig. 1 — Interpretação do antibiograma feito de acordo com a técnica de Bauer e cols. (3) (discos de alta potência).

| Antibiótico ou agente<br>quimioterápico                    | Potência do<br>disco | Diâmetro da zona de inibição em mm |               |            |
|------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|------------|
|                                                            |                      | Resistente                         | Intermediário | Sensível   |
| Ampicilina                                                 |                      |                                    |               |            |
| — Gram-negativo e Enterococo                               | 10 mcg               | 11 ou menos                        | 12—13         | 14 ou mais |
| — Staphylococcus e germes altamente sensíveis à penicilina | 10 mcg               | 20 ou menos                        | 21—28         | 29 ou mais |
| — Haemophilus                                              | 10 mcg               | —                                  | —             | 20 ou mais |
| Bacitracina                                                | 10 U                 | 8 ou menos                         | 9—12          | 13 ou mais |
| Cefaloridina                                               | 30 mcg               | 11 ou menos                        | 12—15         | 16 ou mais |
| Cefalotina                                                 | 30 mcg               | 14 ou menos                        | 15—17         | 18 ou mais |
| Cloranfenicol                                              | 30 mcg               | 12 ou menos                        | 13—17         | 18 ou mais |
| Collistina                                                 | 10 mcg               | 8 ou menos                         | 9—10          | 11 ou mais |
| Eritromicina                                               | 15 mcg               | 13 ou menos                        | 14—17         | 18 ou mais |
| Gentamicina                                                | 10 mcg               | —                                  | —             | 13 ou mais |
| Kanamicina                                                 | 30 mcg               | 13 ou menos                        | 14—17         | 18 ou mais |
| Lincomicina                                                | 2 mcg                | 9 ou menos                         | 10—14         | 15 ou mais |
| Meticilina                                                 | 5 mcg                | 9 ou menos                         | 10—13         | 14 ou mais |
| Oxacilina                                                  | 1 mcg                | 10 ou menos                        | 11—12         | 13 ou mais |
| Ácido nalidixico                                           | 30 mcg               | 13 ou menos                        | 14—18         | 19 ou mais |
| Neomicina                                                  | 30 mcg               | 12 ou menos                        | 13—16         | 17 ou mais |
| Novoblocina                                                | 30 mcg               | 17 ou menos                        | 18—21         | 22 ou mais |
| Nitrofurantoina                                            | 300 mcg              | 14 ou menos                        | 15—16         | 17 ou mais |
| Oleandomicina                                              | 15 mcg               | 11 ou menos                        | 12—16         | 17 ou mais |
| Penicilina G                                               |                      |                                    |               |            |
| Staphylococcus                                             | 10 U                 | 20 ou menos                        | 21—28         | 29 ou mais |
| Outros germes                                              | 10 U                 | 11 ou menos                        | 12—21         | 22 ou mais |
| Polimixina B                                               | 300 U                | 8 ou menos                         | 9—11          | 12 ou mais |
| Estreptomicina                                             | 10 mcg               | 11 ou menos                        | 12—14         | 15 ou mais |
| Sulfonamidas                                               | 300 mcg              | 12 ou menos                        | 13—16         | 17 ou mais |
| Tetraciclina                                               | 30 mcg               | 14 ou menos                        | 15—18         | 19 ou mais |
| Vancomicina                                                | 30 mcg               | 9 ou menos                         | 10—11         | 12 ou mais |

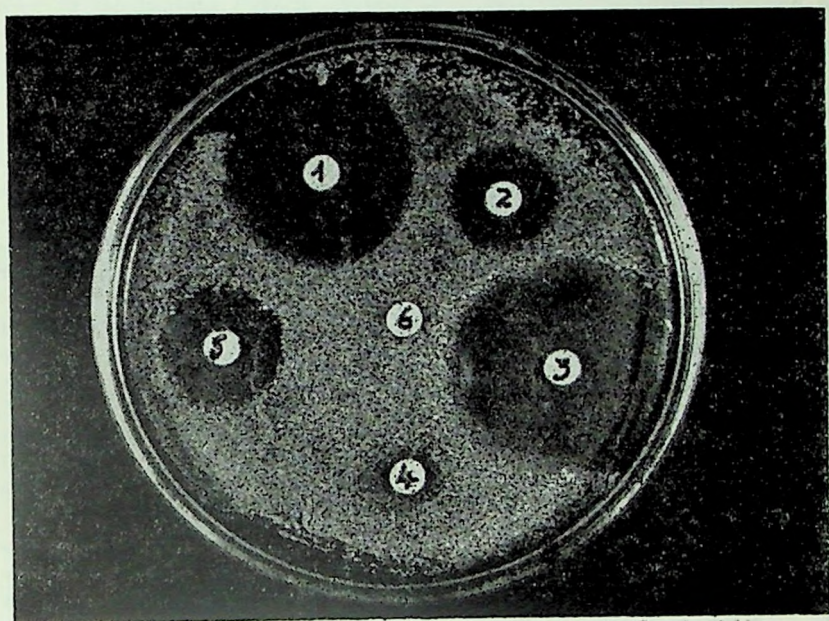


Fig. 2 — Antibiograma de uma raça de *Staph. aureus*.  
Antibióticos 1,3 e 5 — Sensíveis  
Antibióticos 2,4 e 6 — Resistentes

cluír-se que o germe que foi testado é de fato o agente etiológico do quadro patológico.

Quando se trata, porém, de materiais com flora mista, por exemplo secreção uretral de uretrite inespecífica, é difícil afirmar-se se a bactéria encontrada é a responsável pelo quadro clínico.

Por fim, levando-se em conta a frequência com que um microorganismo se torna resistente, podemos estabelecer o seguinte:

1) Germes que dificilmente apresentam células resistentes e para as quais, conseqüentemente não há necessidade da prática do antibiograma: Gonococo, Meningococo, Pneumococo e Estreptococo hemolítico grupo A.

2) Germes que freqüentemente apresentam célula resistente e por isso há necessidade de que a escolha se faça através do antibiograma: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Estafilococo dourado* e *Mycobacterium tuberculosis*.

### RESUMO

A medicina moderna se apóia cada vez mais nos resultados de um antibiograma para a escolha adequada do agente terapêutico, razão porque esse exame deve ser realizado dentro das mais modernas técnicas laboratoriais. O autor prefere para a rotina de seus serviços o método da difusão em agar, com discos impregnados com alta concentração de antibióticos. São descritos e comentados todos os fatores que interferem nos resultados de um antibiograma, merecendo destaque o teor de anti-

biótico contido em cada disco, a sua conservação e o tamanho do inóculo. A umidade é o principal fator inativante dos discos.

Para interpretação de um antibiograma o autor usa o quadro proposto por Bauer e cols., cabendo ao clínico selecionar entre as drogas suscetíveis a mais apropriada para o tratamento. O método descrito possui uma eficiência em torno de 96%.

### SUMMARY

..Modern Medicine is based, more than ever, on Antibiotic Susceptibility Test's results for the proper choosing of the therapeutic agent. For this reason these tests must be performed in accordance with the most modern Laboratory techniques. The Author has chosen for his routine work the diffusion in agar method, using discs impregnated with an high antibiotic concentration. All factors which can interfere on the results of an Antibiotic Susceptibility Test are described and commented in this paper. The antibiotic's concentration in each disc deserves close attention, as well as its conservation, and the width of the inoculum. Moisture is the main cause of the disc's inactivity.

The Author uses for the interpretation of an Antibiotic Susceptibility Teste the scheme proposed by Bauer et cols. The phisican must make a choice, between the susceptible drugs the most suitable for the treatment. The above described method claims to attain an efficiency of something about 96%.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 — BAILEY, W. Robert & SCOTT, Elvyn G. «Determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.» In: Id. *Diagnostic microbiology; a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms*. 3.ed. Saint Louis, C. V. Mosby, 1970. cap.32, p.289-304.
- 2 — BARBER, Mary & GARROD, Lawrence. *Antibiotic and chemotherapy*. London, Livingstone, 1963. cap.27, p.338-51.
- 3 — BAUER, A. W. et alii. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 45(4):493-6, Apr. 1966 [Technical Section]
- 4 — BONDI JR., Amedeo et alii. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *The American Journal of the Medical Sciences*, 213(2):221-5, Feb. 1947.
- 5 — FLOREY, H. W. et alii. *Antibiotics; a survey of penicillin, streptomycin, and other antimicrobial substances, bacteria, and plants*. London, Oxford University Press, 1949. v.2.
- 6 — GRIFFITH, Lewis J. & MULLINS, C. G. Drug resistance as influenced by inactivated sensitivity discs. *Applied Microbiology*, 16(4): 656-8, Apr. 1968.
- 7 — LORIAN, Victor & STRAUSS, Lois. Increased bacterial density at the Edge of antibiotic zones of inhibition. *Journal of Bacteriology*, 92(4):1256-7, Oct. 1966.
- 8 — ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Unificación de métodos para las pruebas de sensibilidad microbiana; segundo informe del Comité de Expertos en Antibióticos. 1971. 27p. (Série de Informes Técnicos, 210).
- 9 — ROSE, S. Brandt & BERKY, John A. A quality control system for disk antibiotic testing. *The American Journal of Clinical Pathology*, 48(2):200-15, Aug. 1967.

Dinarte Ribeiro, 155 — 90.000 — Pôrto Alegre - RS.