UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-graduação em
Análises Clínicas e Toxicológicas
Área de Análises Clínicas

CONTROLE DE QUALIDADE DA PROVA DE SENSIBILIDADE
A ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

Elsa Masae Mamizuka

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Roberto A. de Almeida Moura

SÃO PAULO
1982

Ao Prof. Dr. Roberto Araújo de Almeida Moura,

*os nossos agradecimentos pela dedicação e
orientação não sō durante a realizaçāo desse
trabalho, bem como no decorrer de nossa carreira docente.*

AGRADECIMENTOS

- ao Prof. Dr. Antonio Carlos Zanini, pela confiança e estímulo, colabo
rando no desenvolvimento de nossa carreira científica;
- ao Mário R. Piccollo, Heli Ferreira, Wagner Tavelin, Antonio G. Praça,
Peter Langbayan, ã Etelvina Boccato, Maria do Cão Rafael, Maria Angela
T. Zanini, Sheilla R. Augusto, Christina Oda, Simone Holtzhacker da
secção de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colabora
ção na realização da fase experimental do presente trabalho;
- ao Sr. Sérgio Alves e Pêrsio de A.R. Ebner, pela boa vontade em nos
auxiliar, nas diferentes fases deste trabalho;
- ao Prof. Dr. Bruno Strufaldi e aos colegas Mário H. Hirata e Eduardo
Kokubon, pelos conselhos dados para a elaboração das análises estatís
ticas;
- Ao Prof. Dr. Octávio Armínio Germeck, pela confiança e estímulo ã nos
sa carreira docente;
- às firmas Interlab, Becton Dickinson, Cecon e Roche, pela colabora
ção no fornecimento dos discos de drogas antimicrobianas;
- aos colegas Kátia S. C. Primavera, Yoshimi I. Yamamoto e Mário Rabelo
de Carvalho, pela amizade e estímulo;
- ã Marina B. Martínez e Luciana T. Lomonaco pela amizade;
- ã Maria de Fátima B. Pavan, pelas suas oportunas observações na revi
são linguística do texto e pela constante amizade e estímulo;
- ã Sueli da Silva Cripa e Inês M. M. Imperatriz, pela revisão das refe
rências bibliográficas e
- a todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização
ção deste trabalho,

nossos profundos e sinceros agradecimentos

*"Ceux qui attendent toujours
que tout aille bien pour faire
quelque chose, ne feront jamais rien".*

(anônimo)

Í N D I C E

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	16
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 - Bactérias utilizadas	17
3.2 - Meios de cultura	17
3.3 - Discos de antimicrobianos utilizados	18
3.4 - O antibiograma	20
3.4.1 - Antibiogramas com discos de mesma procedência	20
3.4.2 - O método de Kirby-Bauer	20
3.4.3 - Antibiogramas com discos de procedências diferentes	21
4 - RESULTADOS	23
4.1 - Antibiogramas com discos de mesma procedência	23
4.2 - Antibiogramas com discos de procedências diferentes	33
5 - DISCUSSÃO	39
5.1 - Antibiogramas com discos de mesma procedência	39
5.1.1 - Quanto ao meio de cultura	40
5.1.2 - Quanto à espessura do ágar	48
5.1.3 - Quanto ao inóculo	49
5.1.4 - Quanto às condições de incubação	51
5.1.5 - Quanto aos discos de drogas antimicrobianas	53
5.1.6 - Quanto à leitura dos halos de inibição	59
5.1.7 - Quanto à avaliação do sistema utili_ zado para controlar a qualidade do antibiograma	60
5.2 - Antibiogramas com discos de procedências diferentes	63

	Pág.
6 - CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 - INTRODUÇÃO

A determinação da sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos e quimioterápicos (antibiograma) é uma das provas mais solicitadas em laboratório de microbiologia clínica, pois a terapêutica das infecções bacterianas depende, muitas vezes, do conhecimento da sensibilidade do microrganismo infectante, geralmente determinada por meio de provas "in vitro".

Para que a terapêutica seja eficaz é imprescindível estabelecer o diagnóstico etiológico da infecção, sendo fundamental o papel do laboratório clínico, através do isolamento e da identificação do agente envolvido. Uma vez definida a bactéria causadora da infecção, a escolha do antibiótico ou quimioterápico seria muito fácil, se todas as bactérias apresentassem sensibilidade constante.

A maioria das bactérias, entretanto, apresenta amplas variações, sendo que um grande número desenvolve resistência múltipla, abrangendo quase todas as drogas usadas no arsenal terapêutico.

Cabe ao laboratório de microbiologia clínica realizar adequadamente o antibiograma e compete ao clínico a escolha do antibiótico ou quimioterápico mais indicado ao caso, baseado não apenas nas provas de sensibilidade mas também no conhecimento de propriedades farmacológicas das drogas e de seus efeitos colaterais.

Muitas variáveis podem afetar o curso de uma infecção e a eficácia da terapêutica antimicrobiana. Há o

envolvimento de fatores relacionados não só com a droga e com o germe, mas também com o hospedeiro. De todos os fatores em jogo, somente a sensibilidade bacteriana à droga é passível de uma quantificação "in vitro", fornecendo assim um ponto de referência de grande utilidade para a seleção da terapêutica apropriada.

As provas de sensibilidade "in vitro" medem a capacidade do antibiótico ou quimioterápico em inibir o crescimento bacteriano e podem ser realizadas por métodos de difusão ou de diluição^{11,23}. Nas provas que se utilizam de difusão, são colocados discos de papel impregnados com antibióticos ou quimioterápicos na superfície do ágar previamente semeado, uniformemente, com o microrganismo em estudo^{10,21,24,29,31,58,61,74}.

A partir do disco, forma-se no ágar um gradiente de concentração do antibiótico ou quimioterápico e conseqüente inibição de crescimento do microrganismo a eles sensível, caracterizado por uma área circular, ao redor do disco, denominada de zona de inibição.

Nos métodos de diluição^{11,22,23,25}, meios de cultura contendo concentrações diferentes de antibióticos ou quimioterápicos, são inoculados com o microrganismo em estudo. Após incubação adequada, a menor concentração do agente antimicrobiano que causa a completa inibição de crescimento do microrganismo é considerada a concentração inibitória mínima (CIM). A correlação da concentração inibitória mínima com o diâmetro da zona de inibição, é a base para avaliar-se a sensibilidade pelo método da difusão com disco. Apesar de trabalhoso, o método de diluição é tido como padrão

para determinação de sensibilidade, e é recomendado como controle de qualidade a ser executado em paralelo, periodicamente, com os outros métodos.

Com o advento de novos antibióticos e quimioterápicos durante a década de 1940, o método de diluição deixou de ser prático para atender às demandas do grande número de exames.

Em 1943, Foster e Woodruff³² relataram pela primeira vez o uso de antibióticos impregnados em tiras de papel de filtro para realizar a prova de sensibilidade. Estas tiras eram impregnadas com soluções de antibióticos e colocadas em seguida sobre o ágar previamente inoculado com o microrganismo a ser testado. Esse processo apresentava vantagens sobre o da diluição pois poderia ser verificada a ação de mais de uma droga antimicrobiana pelo uso de várias tiras, com diferentes antimicrobianos, numa só placa.

Vincent e Vincent⁶⁷ introduziram o uso de discos de papel em 1944, aumentando ainda mais o número de antibióticos e quimioterápicos que poderiam ser testados simultaneamente. Um ano mais tarde, Morley⁴⁸ demonstrou que os discos de papel poderiam ser secos após a aplicação da solução de antibióticos ou quimioterápicos e armazenados, evitando desta forma a necessidade de se ter soluções recentemente preparadas, cada vez que a prova fosse realizada. Esta descoberta fez com que firmas comerciais logo passassem a produzir discos impregnados com drogas antimicrobianas para as provas de sensibilidade.

Bondi e cols.¹⁴ foram os primeiros a propor

alguma padronização das diversas concentrações de antibióticos e quimioterápicos utilizadas em discos. A partir daí surgiram as primeiras aplicações do resultado da prova de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos no tratamento de pacientes com doenças infecciosas. No final da década de 1950, os resultados das provas de sensibilidade antimicrobiana, realizadas no mundo todo, refletiam uma grande imprecisão, devido à falta de uma padronização mais adequada. Haviam enormes variações que decorriam do uso de diferentes concentrações de antibióticos e quimioterápicos nos discos, de diferentes meios de cultura, de métodos de inoculação não padronizados, de tempos de incubação diferentes e até da leitura e da interpretação dos resultados feitas de diversas maneiras.

Ao lado desses resultados, totalmente não confiáveis, a indústria dos antibióticos e quimioterápicos florescia, com grande respaldo clínico. Tornou-se evidente que os erros de indicação de drogas antimicrobianas eram provenientes, em sua maioria, dos próprios laboratórios de análises.

No Segundo Relatório do Comitê de Especialistas em Antibióticos da Organização Mundial de Saúde⁵⁰ foi salientada a grande necessidade de padronização das provas de sensibilidade a drogas antimicrobianas. Em 1971, baseadas num estudo preliminar de um grupo de trabalho coordenado por Ericson²⁴ envolvendo vários laboratórios de diferentes locais do mundo, patrocinado por aquela Organização, foram feitas recomendações específicas, tendo sido estabelecidas regras para que os laboratórios seguissem na realização das

provas de sensibilidade pelo método dos discos.

O Comitê de Especialistas em Antibióticos observou ainda que os resultados das medições de sensibilidade não apresentavam valores absolutos, visto serem eles influenciados pelas condições em que as provas eram realizadas, tais como: diferenças na concentração do inóculo, na composição e no pH do meio de cultura ou na temperatura de incubação, entre outras, as quais podem influir na concentração da droga antimicrobiana necessária para inibir um microrganismo "in vitro". Assim, a concentração inibitória mínima de um antibiótico ou quimioterápico para um microrganismo, depende das condições em que estas provas são realizadas.

Atualmente existem três provas padronizadas³, a saber:

- a) o método das diluições em caldo e em ágar;
- b) o método da eluição de discos de antibióticos e
- c) o método de difusão com disco, descrito por Bauer e cols.¹⁰, conhecido como método de Kirby-Bauer, ligeiramente modificado e recomendado pelo FDA (Agência Federal dos Estados Unidos da América que controla alimentos e medicamentos), para uso de rotina²⁴.

Os métodos padronizados, devem ser seguidos à risca, pois qualquer modificação da metodologia pode causar mudanças significativas nos resultados.

Segundo a publicação da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.)⁵¹, são poucos os países que fabricam discos

de antimicrobianos e por conseguinte, regulamentos internacionais que determinem sua qualidade seriam de grande valia tanto para os países que dependem da importação desses materiais quanto para os que pretendam fabricá-los.

As maiores dificuldades encontradas entre os diversos países estão relacionadas com as provas para comprovar a eficácia dos discos utilizados nos testes de sensibilidade. As provas são realizadas sob diferentes condições, sem um ponto de referência comum. A interpretação dos diâmetros das zonas tem constituído problema constante em muitos países. A finalidade do teste é de avaliar a sensibilidade ou a resistência de um microrganismo a um determinado antibiótico ou quimioterápico para que o clínico possa tratar a infecção com êxito. Isso implica em que o nível de antimicrobio ao qual o microrganismo se mostra sensível, possa ser alcançado no organismo humano no local da infecção. Embora não haja acordo internacional sobre esses níveis, os especialistas da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) ressaltam a necessidade de orientar os países com pouca experiência nessa técnica⁵¹.

Por esse motivo, nas recomendações específicas apresentadas pelo Comitê de Peritos em Antibióticos da O.M.S., foi incluída uma tabela de diâmetros de zonas, que discrimina uma determinada cepa de microrganismo como sensivel ou resistente ou apresenta uma sensibilidade intermediária.

A técnica de difusão desenvolvida por Bauer e cols.¹⁰, é a recomendada e tem sido a mais amplamente utilizada em laboratório clínico. Este método leva em conta o

meio de cultura empregado, o inóculo da bactéria, os discos utilizados, as condições de incubação e os critérios de leitura.

1 - Meio de cultura

1.a) - Composição

A composição do meio de cultura é de fundamental importância nesta prova. Meios comuns apresentam ácido paraminobenzóico, que é um constituinte geralmente presente em peptonas e que compete com sulfamídicos, reduzindo sua ação nas provas. A presença de eletrólitos como Mg^{++} e Ca^{++} reduz a atividade de determinados antibióticos como as tetraciclinas e os aminoglicosídeos, principalmente frente a microrganismos como Pseudomonas aeruginosa^{19,66,75}.

O meio de ágar-Mueller Hinton é atualmente o mais recomendado por oferecer boas condições de desenvolvimento dos principais patógenos.

1.b) - pH

O pH final do meio de cultura após seu resfriamento deve estar entre 7,2 e 7,4.

1.c) - Espessura do meio e umidade

O meio deve estar distribuído em camada uniforme de 4 a 6 mm de espessura, em placas de fundo chato. As placas devem ter uma umidade que permita a pronta absorção do inóculo e a difusão da droga, devendo ser usadas pelo menos após 30 minutos depois de preparadas e até com um máximo de 5 dias, se conservadas em geladeira.

2 - Inóculo

A concentração de germes viáveis a ser usada na prova é importante (ao redor de 10^8 bactérias por mL, com paradas na escala de turvação de Mac Farland) pois influi na formação do halo de inibição e, portanto, na interpretação do grau de sensibilidade do germe. Na preparação do inóculo devem ser usadas colônias isoladas e representativas da população em estudo, sendo contra-indicado fazer antibiograma com mais de um germe na mesma placa ou com o material colhido diretamente do paciente⁵⁹.

3 - Discos de antibióticos e quimioterápicos

3.a) - Potência

De acordo com o padrão oficial do Centro Nacional de Análise de Antibióticos e de Insulina, da Divisão de Ciências Farmacêuticas da FDA, dos Estados Unidos da América, os discos de antibióticos ou quimioterápicos não podem conter mais do que 150% de seu valor declarado nem menos que 67% desse valor³¹.

3.b) - Discos

O papel de filtro utilizado para a confecção dos discos deverá ter pH neutro, e não conter substâncias que possam interferir nos agentes antimicrobianos contidos nos discos.

Os discos deverão ter 6,35 mm de diâmetro, ser de cor branca, pesar de 30 a 40 mg, e absorver água numa proporção de 2,5 a 3 vezes o seu peso.

3.c) Colocação dos discos

Os discos de antimicrobianos são colocados so
bre a superfície da placa e levemente pressionados. Os dis
cos devem ficar distantes uns dos outros o suficiente para
evitar a possibilidade de uma confluência de zonas, e devem
ficar a 1,5 cm dos bordos da placa. Discos com drogas que
apresentam pouca difusão no ágar são colocados na região
central da placa, para economia de espaço.

3.d) Armazenagem

Assim que recebidos, os discos devem ser con
servados a uma temperatura de 20º abaixo de zero. Isto é par
ticularmente importante para antibióticos como penicilinas
e cefalosporinas. Os discos em uso são guardados na geladeii
ra.

3.e) Seleção dos discos a serem utilizados

Baseados em inúmeras considerações, incluindo
fatores microbiológicos e clínico-farmacológicos, o Comitê
de Padronização de Laboratório Clínico dos Estados Unidos
da América, NCCLS (National Committee for Clinical Laborator
y Standards)²⁹ sugeriu drogas de uso corrente consideradas
apropriadas. Estas drogas, segundo aquele Comitê, preenchem
as necessidades básicas para o seu uso na rotina da maioria
dos laboratórios clínicos, podendo haver disponibilidade de
outras drogas que não fazem parte desta tabela para serem
usadas de acordo com as necessidades em situações especiais
de pacientes ou da própria instituição. Outras drogas, além
destas sugeridas para fins terapêuticos, podem ser testadas
para obter informações epidemiológicas ou dados taxonômicos.

Entretanto, para evitar a má interpretação, o relatório de rotina enviado ao clínico deve incluir somente aquelas drogas apropriadas para uso terapêutico. Determinadas drogas podem ser adicionadas ou retiradas desta lista básica desde que estejam de acordo com os membros do corpo clínico do hospital.

É de boa norma o uso dos nomes oficiais ao se referir às drogas antimicrobianas.

Para simplificar os antibiogramas feitos de rotina, deve-se limitar o número de drogas utilizadas, devendo-se incluir um representante de cada classe de droga antimicrobiana que tenha um espectro nitidamente diferenciado "in vitro". Os antimicrobianos utilizados nesta prova também devem se limitar a drogas comumente usadas na terapêutica de pacientes com enfermidades causadas por patógenos específicos. Afora drogas de amplo espectro, na rotina são usadas drogas para testar bactérias Gram positivas, diferentes de drogas para testar bactérias Gram negativas.

Certos antimicrobianos, como a nitrofurantoina e o ácido nalidíxico, são limitados para serem usados no tratamento de infecções urinárias. Estas drogas somente devem ser utilizadas para testar microrganismos isolados de urina ou de material uro-genital. Mandelato de metanamida não deve ser utilizado no testes "in vitro" pois sua ação é completamente diferente "in vivo".

É freqüente em nosso meio, a solicitação para testar vários representantes de cada grupo de antimicrobianos, inclusive sem atentar quanto as propriedades inerentes

aos germes. Esta prática normalmente resulta em gastos extraordinários e a informações imprecisas que somente servem para desorientar o clínico. O mesmo ocorre quando se testa determinadas drogas que apresentam maior atividade "in vivo" do que "in vitro". Neste caso, temos como exemplo o tianfenicol, que apresenta o mesmo espectro de ação que o cloranfenicol e difere apenas do mesmo pela substituição de um radical NO_2^- por SO_2^{--} na sua fórmula química⁴⁹. A sua eficácia para determinados microrganismos é menor "in vitro", não devendo portanto ser testado em laboratório clínico.

A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratories Standards)²⁹ sugere alguns critérios para a melhor seleção de discos de antimicrobianos a serem utilizados em provas de sensibilidade:

- Quanto ao grupo das penicilinas: recomenda-se em geral o uso da penicilina G (sensível a penicilinase) para testar todos os estafilococos e uma penicilina resistente a penicilinase, como oxacilina, nafcilina ou metici-lina. A ampicilina deve ser usada para testar enterobactéri-as, mas não serve para testar estafilococos devido a sua baixa atividade em relação a este germe e por mostrar sensi-bilidade à penicilinase como ocorre com a penicilina G. Por outro lado, a carbenicilina deve ser testada com Pseudomonas sp e enterobactérias.

- Quanto às cefalosporinas: a cefalotina po-dia ser usada até 1978 como representante da classe das ce-falosporinas. Entretanto, foram aprovados recentemente dois antibióticos, o cefamandol e a cefoxitina que devem ser tes-tados separadamente pois são ativos "in vitro" contra cepas

de enterobactérias resistentes à cefalotina. Ao testar cefalosporinas contra germes Gram positivos, é suficiente o uso da cefalotina. O espectro de atividade do cefamandol e da cefoxitina é bastante diferente e um não pode substituir o outro, além dos dois não poderem substituir outras cefalosporinas.

- Quanto às tetraciclinas: as drogas pertencentes a este grupo são bastante relacionadas, sendo suficiente o uso somente da tetraciclina.

- Quanto às polimixinas: a polimixina B e a polimixina E (colistina) são estreitamente relacionadas e nos Estados Unidos da América são raramente utilizadas. Quando for indicado, apenas uma delas deve ser testada. A polimixina difunde-se mau no meio com ágar, sendo portanto o método de difusão menos preciso do que acontece com outros antibióticos, porém a resistência é sempre significativa. Entretanto, se esta droga for a escolhida para terapêutica de infecções sistêmicas devido a cepas aparentemente sensíveis a ela, recomenda-se a confirmação pelo método da diluição.

- Quanto aos macrolídeos: pela prática atual nos Estados Unidos da América, a eritromicina é o único macrolídeo que precisa ser testado.

- Quanto às lincomicina: este grupo inclui lincomicina e clindamicina, sendo que para provas feitas de rotina é recomendada a clindamicina.

- Quanto aos ácidos orgânicos: este grupo de compostos utilizados no tratamento de infecções do trato urinário inclui o ácido nalidíxico, ácido oxolínico e o ácido

do pipemídico. Para provas "in vitro" é indicado o ácido na lidíxico.

- Quanto às sulfonamidas: este grupo de compostos inclui uma ampla variedade de quimioterápicos com espectro de atividade semelhante. Sulfixazol e a sulfonamida são mais comumente utilizadas para tratamento de infecções urinárias, podendo ser selecionadas para uso nas provas "in vitro". Trimetoprim combinado com sulfametoxazol pode produzir efeito sinérgico que aumenta muito o espectro de atividade antimicrobiana.

- Classe de drogas simples: agentes antimicrobiobianos como cloranfenicol, vancomicina e nitrofurantoina não possuem nenhum composto relacionado e o seu uso é apropriado para provas "in vitro".

4 - Tempo de incubação, temperatura e condi ções de aerobiose

As placas contendo o germe em estudo e os discos são incubadas por uma noite (ao redor de 18 horas), a uma temperatura de 35-37°C, em posição invertida.

A incubação, em geral, é feita na estufa bacteriológica comum, mas para algumas espécies há necessidade de uma incubação em atmosfera de CO₂. Outras vezes há necessidade de condições de anaerobiose.

Existem restrições no que se refere a incuba-ção em anaerobiose e em atmosfera de CO₂, onde não devem ser usadas as curvas de regressão ou outros critérios de interpretação baseados nos dados obtidos em condições aeróbicas²⁹.

5 - Leitura do diâmetro das zonas

O diâmetro de cada zona de inibição deve ser medido, em milímetros, com um paquímetro ou com uma régua, com suficiente precisão a fim de determinar a categoria adequada de sensibilidade. A leitura da zona, incluindo o disco, mede o diâmetro do halo formado.

Colônias muito pequenas situadas dentro da zona de inibição, visíveis apenas sob certas condições de iluminação, são ignoradas. Certos microrganismos podem formar grandes colônias dentro da zona de inibição de certos antibióticos, como a ampicilina e a cefalotina. Essas colônias são eventualmente levadas em conta para delimitar o diâmetro da zona de inibição. Se as colônias aparecem em toda zona de inibição é o caso de verificar-se a pureza da cultura, e repetir o teste, com amostra re-isolada, se realmente houve contaminação.

6 - Interpretação dos resultados

O método de Kirby-Bauer, atualmente adaptado para a conversão dos resultados das zonas de inibição em concentração inibitória mínima, leva em consideração todos os fatores mencionados, além da concentração atingida pela droga no organismo. Um microrganismo é considerado sensível quando for inibido pela dose terapêutica da droga em questão.

Esses parâmetros são seguidos por todos os laboratórios dos diversos países, que se utilizam da metodologia padronizada.

Em nosso meio enfrentamos dificuldades crescentes com importação, especialmente de reagentes, incluindo nestes os discos para provas de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos e os próprios meios de cultura.

Estas dificuldades aumentaram com a súbita expansão do número de laboratórios.

De alguns anos para cá, indústrias nacionais passaram a se interessar pela confecção de discos. No início a fabricação era insipiente devido à pequena escala. A consciência sobre a necessidade do estudo da sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos foi se aprofundando cada vez mais. A maior demanda aumentou o consumo de discos, não só os de boa qualidade e mantidos em ótimas condições de conservação, como também os de origem discutível ou mal conservados.

A confiança nos resultados das provas de sensibilidade às drogas antimicrobianas tornou-se, portanto, inteiramente dependente do controle de qualidade. Além dos parâmetros já considerados, devemos saber também se os discos para provas de sensibilidade, originariamente de boa qualidade, continuam devidamente conservados até o momento de uso. Até mesmo discos importados, de procedência internacionalmente garantida, podem estar deficientes devido às dificuldades encontradas na importação ou no armazenamento e transporte, em nosso país.

2 - OBJETIVOS

Devido à falta de uniformidade dos discos de antibióticos e quimioterápicos utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica e ao desconhecimento das condições em que esses discos são submetidos desde sua fabricação até a entrega ao laboratório clínico, redundando sempre em falta de reprodutibilidade e conseqüente confiabilidade, propo-
semo-nos a:

1 - controlar a qualidade de antibiogramas a
través de estirpes bacterianas padrão, em paralelo com mi-
croorganismos provenientes de materiais clínicos, utilizando
discos de antimicrobianos de uma única procedência;

2 - comparar os antibiogramas obtidos com dis-
cos de diferentes procedências, utilizando amostras bacte-
rianas padrão e

3 - avaliar os resultados obtidos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - BACTÉRIAS UTILIZADAS

Foram utilizadas estirpes bacterianas padrão comercializadas pela firma Difco (Difco Laboratories - De
troit - E.U.A.). Tratam-se de bactérias liofilizadas procedentes da ATCC (American Type Culture Collection) reconstit
tuidas posteriormente em caldo tripticase-soja.

As cepas utilizadas foram as seguintes: Sta-
phylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922
e Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

3.2 - MEIOS DE CULTURA

3.2.1 - Caldo tripticase-soja (Oxoid)

De acordo com as indicações do fabricante, for
ram dissolvidos 30 g do meio comercial desidratado em 1 L
de água destilada. Após homogeneização e distribuição em tub
os de 13x100 mm, em alíquotas de 3 mL, os tubos foram tamp
ponados com algodão hidrófobo e esterilizados por autoclavav
agem, durante 15 minutos à temperatura de 121°C. Após a ester
ilização, os tubos foram conservados em geladeira até o mom
ento de uso.

3.2.2 - Ágar-Mueller Hinton (Difco)

De acordo com as intruções do fabricante, for
ram dissolvidos 38 g do meio comercial desidratado em 1 L
de água destilada, utilizando-se aquecimento até completar
a dissolução. Após a distribuição em frascos com capacidade
de 2 L, tamponados com algodão hidrófobo, procedeu-se a auv

tooclavagem durante 15 minutos à temperatura de 121°C. Após o resfriamento, ao redor de 50°C, o meio foi distribuído em placas de Petri descartáveis de 150 mm de diâmetro numa camada uniforme, plana, com espessura média de 4 mm.

Para a distribuição do meio foi utilizado o aparelho Petrimat-150 com sistema automático de distribuição, da firma "Strauer" de origem dinamarquesa. As placas eram mantidas com tampas semi-abertas até a solidificação do ágar, sobre uma superfície plana.

O pH do meio foi acertado a 7,4 após o resfriamento do ágar à temperatura aproximada de 45°C.

3.2.3 - Ágar tripticase-soja (Difco)

De acordo com as indicações do fabricante, foram dissolvidos 40 g do meio comercial desidratado em 1 L de água destilada, utilizando-se aquecimento para a dissolução completa. Após a distribuição de alíquotas de 5 mL em frasco-ampolas com capacidade de 20 mL, os mesmos eram fechados com tampa de borracha e lacrados com selo metálico. Os frascos eram esterilizados por autoclavagem durante 15 minutos à temperatura de 121°C.

Logo após a esterilização, os frascos eram mantidos em posição inclinada, em ângulo aproximado de 45°, até a solidificação do meio de cultura e conservados em geladeira até o momento de uso.

3.3 - DISCOS DE ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS

a) Para o estudo do antibiograma com discos de uma só procedência - BBL (Baltimore Biological Laboratory

ries) - foram utilizadas as seguintes drogas antimicrobianas: amicacina (10 ug), ampicilina (10 ug), canamicina (30 ug) , carbenicilina (100 ug), cefalotina (30 ug), cloranfenicol - (30 ug), colistina (10 ug), eritromicina (15 ug), estreptomicina (10 ug), gentamicina (30 ug), lincomicina (2 ug), nitrofurantoina (300 ug), novobiocina (30 ug), oxacilina (1 ug), penicilina (10 U), sulfadiazina (250 ug), sulfametoxazol-trimetoprim (1,25 ug + 23,7 ug), tetraciclina (30 ug).

b) Para o estudo do antibiograma com discos de diferentes procedências, foram utilizadas as seguintes drogas antimicrobianas:

- das firmas Difco, BBL e Cecon: amicacina(10 ug), ampicilina (10 ug), canamicina (30 ug), carbenicilina (30 ug), cefalotina (30 ug), cloranfenicol (30 ug), colistina (10 ug), eritromicina (15 ug), estreptomicina (10 ug) , gentamicina (30 ug), lincomicina (2 ug), neomicina (30 ug), novobiocina (30 ug), oxacilina (1 ug), penicilina (10 U) , sulfametoxazol-trimetoprim (1,25 ug + 23,75 ug) e tetraciclina (30 ug).

- da firma Rosco (discos em comprimido): ampicilina (33 ug), canamicina (100 ug), cloranfenicol (120 ug), colistina (150 ug), eritromicina (78 ug), estreptomicina - (160 ug), gentamicina (40 ug), lincomicina (19 ug), neomicina (120 ug), nitrofurantoina (260 ug), penicilina (8 U) , sulfadiazina (240 ug), sulfametoxazol-trimetoprim (5,2 ug + 240 ug) e tetraciclina (80 ug).

3.4 - O ANTIBIOGRAMA

3.4.1 - Antibiogramas com discos de mesma procedência

Foram realizados antibiogramas, de acordo com o método de Kirby-Bauer e cols.¹⁰, empregando discos de antibióticos e quimioterápicos de mesma procedência - BBL (Baltimore Biological Laboratories - E.U.A.) - adquiridos para a rotina do laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Durante a prova, os discos eram guardados em geladeira nas embalagens fornecidas pelo fabricante.

Os microrganismos padrão foram mantidos em subculturas no meio de ágar tripticase-soja, após a recuperação da forma liofilizada. Estas subculturas eram submetidas semanalmente a provas de sensibilidade, juntamente com os outros microrganismos isolados de materiais clínicos provenientes da rotina do laboratório.

3.4.2 - O método de Kirby-Bauer

Quatro a cinco colônias de bactérias a serem testadas eram repicadas em caldo tripticase-soja e incubadas de 2 a 5 horas à temperatura de 35 a 37°C.

A turbidez do crescimento em caldo era ajustada em comparação com um padrão de turvação (0,5 mL de BaCl_2 0,048M em 99,5 mL de H_2SO_4 0,36N).

Dentro de 15 minutos a partir do acerto da turbidez, era introduzido um "swab" esterilizado na suspensão bacteriana. O excesso do caldo era removido pressionando-se

o "swab" contra a parede do tubo e em seguida o material era semeado por toda a superfície da placa, em estrias uniformes, pouco espaçadas e em três direções.

Após a semeadura, os discos eram depositados sobre a superfície do meio com o distribuidor automático da BBL e o espaçamento entre eles era de aproximadamente 3cm. Com o auxílio de uma pinça esterilizada, os discos eram em seguida pressionados na superfície do meio de cultura, para garantir um contacto firme. Após a colocação dos discos, as placas eram incubadas de 16 a 18 horas à temperatura de 35 a 37°C, em aerobiose.

Depois deste período de incubação foram feitas leituras dos halos de inibição, em milímetros, com auxílio de uma régua.

3.4.3 - Antibiogramas com discos de procedências dife- rentes

Os discos de procedências diferentes foram ob^utidos por doação dos seus respectivos representantes comerciais, através de correspondência em que tinha sido especificado o plano de usá-los comparativamente.

Utilizamos discos importados das seguintes firmas: A) BBL (Baltimore Biological Laboratories - Estados Unidos da América), B) Cecon (Brasil), C) Difco (Difco Laboratories - Estados Unidos da América), D) Rosco (Rosco S/A - Dinamarca).

Todos os discos foram mantidos em geladeira, de acordo com as recomendações dos fabricantes, até o momento de uso.

As provas foram feitas em meio de ágar-Mueller Hinton (Difco) e em placas de 90 mm de diâmetro.

Após a semeadura homogênea das placas, os discos de antibióticos e quimioterápicos eram colocados sobre a superfície do ágar com auxílio de uma pinça esterilizada por flambagem. Em cada placa foram depositados apenas quatro discos da mesma droga antimicrobiana (um de cada firma diferente).

Enquanto os discos das firmas BBL, Difco e Cecon eram padronizados, os da firma Rosco apresentavam-se na forma de comprimidos e com concentrações diferentes.

Os discos de procedências diferentes foram colocados numa mesma placa para que fossem submetidos às mesmas condições, durante a prova.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica durante 16 a 18 horas, em temperatura de 35 a 37°C, após o que foram lidos os diâmetros da zona de inibição por meio de uma régua.

4 - RESULTADOS

4.1 - ANTIBIOGRAMAS COM DISCOS DE MESMA PROCEDÊNCIA

Foram feitos antibiogramas de cepas bacterianas padrão em paralelo com outras bactérias isoladas de materiais clínicos, utilizando-se discos de uma única procedência, durante um período de 20 semanas, em testes semanais.

Os resultados obtidos foram registrados da seguinte forma: o valor do diâmetro da zona de inibição de cada droga utilizada no antibiograma era anotado (em milímetros) numa tabela e mais tarde transcrito em cartão milimetrado, semelhante ao sistema de Levey e Jennings⁴⁵. Desta forma eram marcados na abscissa os dias em que as provas eram realizadas e na ordenada, os valores médios do halo de inibição e desvio padrão calculados e estabelecidos para cada cepa bacteriana padrão utilizada, frente às drogas antimicrobianas testadas.

Os valores dos halos de inibição obtidos eram representados em forma de ponto no gráfico referente a cada droga utilizada, a fim de facilitar a avaliação dos resultados.

Desta forma podíamos verificar facilmente se os valores estavam de acordo com o intervalo de confiança estabelecido para cada agente antimicrobiano, frente aos microrganismos padrão utilizados.

No Gráfico 1 são apresentados os dados da Tabela I referentes às provas feitas com Staphylococcus aureus ATCC:25923. O Gráfico 2 apresenta os dados da Tabela II, referentes às provas feitas com Escherichia coli ATCC: 25922 e o Gráfico 3, correspondente à Tabela III, mostra os resultados obtidos com Pseudomonas aeruginosa ATCC: 27853.

TABELA I

Resultados dos diâmetros do halo de inibição (mm) utilizando Staphylococcus aureus ATCC:25923

ANTIMICRO- BIANOS	SEMANAS																				Limites de confiança (diâmetro em mm)	Resultados fora dos limites de confiança	% de discordância
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
Amicacina	18	18	20	24	19	18	21	19	18	17	18	20	19	18	19	16	19	18	19	19	18-24	(2)	10
Ampicilina	29	29	33	30	26	29	30	29	29	25	25	14	27	25	29	29	29	25	31	29	24-35	(1)	5
Canamicina	21	18	24	24	20	20	22	22	24	18	20	23	23	24	24	19	21	20	26	22	19-26	(2)	10
Cefalotina	31	29	33	33	26	33	33	32	34	25	28	30	25	28	33	18	25	27	34	27	25-37	(1)	5
Cloranfenicol	25	23	21	22	18	22	25	21	21	20	19	25	20	21	23	18	22	22	23	20	19-26	(2)	10
Eritromicina	24	24	26	30	23	25	25	21	20	18	24	23	20	26	26	20	22	22	30	22	22-30	(5)	25
Estreptomicina	16	12	19	18	18	18	19	17	16	16	17	19	17	18	19	15	16	16	19	17	14-22	(1)	5
Centamicina	19	19	23	23	15	20	22	21	22	19	20	23	21	23	24	17	21	20	23	21	19-27	(2)	10
Lincomicina	18	28	21	21	18	18	20	16	10	17	14	20	18	18	19	19	21	18	22	21	23-29	(19)	95
Nitrofurantoina	--	--	19	--	21	--	--	21	22	--	22	--	--	24	23	--	--	19	--	--	20-24	(2)	25
Novobiocina	28	24	30	28	28	25	28	25	28	20	29	28	24	28	30	23	25	23	28	23	22-31	(1)	5
Oxacilina	20	13	19	16	18	20	18	15	20	17	19	18	17	18	23	13	20	18	22	20	19-22	(12)	60
Penicilina	30	29	34	30	27	30	29	25	27	22	24	9	21	32	31	29	29	27	30	27	26-37	(5)	25
Sulfadiazina	--	25	--	--	28	25	--	0	26	--	23	--	--	26	27	--	--	25	--	--	24-34	(2)	22
Sulfametoxazol- -trimetoprim	--	28	--	--	25	28	--	--	--	27	28	--	--	27	27	--	--	0	26	--	24-32	(1)	10
tetraciclina	26	26	26	25	27	20	25	25	24	19	24	10	23	26	28	20	21	21	26	22	19-28	(1)	5

Gráfico 1 - *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923

TABELA II

Resultados dos diâmetros do halo de inibição (mm) utilizando Escherichia coli ATCC:25922

ANTIMICRO BIÓTICOS	SEMANAS																				Limites de confiança (diâmetro em mm)	Resultados fora dos limites de confiança	% de discordância
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
Amicacina	19	19	20	18	23	18	18	19	18	17	16	19	16	16	18	16	18	20	24	15	18-24	(6)	30
Ampicilina	20	19	22	17	22	16	13	21	16	19	20	20	17	14	20	16	20	17	27	16	15-20	(5)	25
Canamicina	20	22	26	21	23	20	20	20	19	20	19	21	19	21	21	20	19	20	24	20	17-25	(1)	5
Carbenicilina	22	24	30	23	30	19	--	24	--	25	26	--	--	--	26	--	19	--	--	23	24-29	(7)	58
Cefalotina	19	19	24	20	22	18	18	19	19	18	18	20	15	16	21	17	18	20	26	18	18-23	(5)	25
Cloranfenicol	25	26	30	25	28	22	25	26	26	24	24	26	24	24	27	23	24	22	30	22	21-27	(3)	15
Colistina	13	13	14	12	13	14	12	13	12	13	13	14	12	12	13	11	13	11	15	12	11-15	(0)	0
Estreotomicina	16	18	18	17	18	16	17	15	16	17	14	18	16	16	17	16	16	17	20	14	12-20	(0)	0
Gentamicina	20	22	25	21	21	20	20	20	19	20	19	21	19	20	22	19	20	20	25	17	19-26	(1)	5
Nitrofurantoina	--	--	--	--	--	--	--	--	21	--	20	--	21	--	22	--	20	--	--	--	21-26	(2)	40
Sulfadiazina	--	--	--	--	--	--	--	--	22	--	20	--	21	--	22	--	20	--	--	--	18-26	(0)	0
Sulfametoxazol- -trimetoprim	--	--	--	--	--	--	--	--	24	--	26	--	26	--	27	--	26	--	--	--	24-32	(0)	0
tetraciclina	21	23	25	22	24	23	20	22	22	20	23	23	22	21	24	20	23	19	26	20	18-25	(1)	5

Gráfico 2 - Escherichia coli ATCC: 25922

TABELA III

Resultados dos diâmetros do halo de inibição (mm) utilizando Pseudomonas aeruginosa ATCC:27853

ANTIMICRO- BIOS	S.E.A. 1975																				Limites de confiança (diâmetro em mm)	Resultados fora dos limites de confiança	% de discordância
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
Amicacina	15	20	16	15	23	16	19	18	14	20	17	16	17	15	19	14	16	15	17	22	15-21	(4)	20
Carbenicilina	21	—	—	20	27	—	25	12	—	23	26	—	17	20	—	—	18	—	13	—	20-24	(6)	53
Colistina	13	18	11	12	18	13	13	16	13	16	16	12	12	13	17	11	13	12	13	15	11-15	(6)	30
Gentamicina	17	26	16	16	26	18	20	20	19	19	21	16	17	18	20	16	17	15	19	24	16-21	(4)	20

Gráfico 3 - Pseudomonas aeruginosa ATCC: 27853

colistina - 10 ug

amicacina - 10 ug

carbenicilina - 100 ug

gentamicina - 30 ug

Na Tabela I e no Gráfico 1 verificamos que os resultados mais alterados estão relacionados com lincomicina, oxacilina, eritromicina, nitrofurantoina, penicilina e sulfadiazina. Tais resultados são apresentados na Tabela IV.

TABELA IV

Drogas antimicrobianas com resultados
abaixo dos limites de confiança

Drogas antimicrobianas	Total de antimicrobianos	Resultados abaixo dos limites de confiança
Lincomicina	20	19 (95%)
Oxacilina	20	12 (60%)
Eritromicina	20	5 (25%)
Nitrofurantoina	8	2 (25%)
Penicilina	20	5 (25%)
Sulfadiazina	9	2 (22%)

Os resultados menos alterados estão relacionados com ampicilina, cefalotina, estreptomicina, novobiocina e tetraciclina. Estas drogas apresentaram apenas um resultado abaixo dos limites de confiança em vinte provas realizadas.

Analisando a Tabela I e o Gráfico 1 quanto à variação semanal, podemos observar que em cinco determinações, os antibiogramas realizados com Staphylococcus aureus padrão, apresentaram resultados abaixo dos limites de confiança, conforme apresentamos na Tabela V.

TABELA V

Resultados abaixo dos limites de confiança

Semanas da prova	Total de antimicrobianos	Resultados abaixo dos limites de confiança
8	15	5 (33%)
10	14	7 (50%)
12	13	5 (38%)
13	13	4 (31%)
16	13	7 (54%)

Nas demais semanas, pelo menos um antimicrobiano apresentou-se acima ou abaixo do intervalo de confiança.

Na Tabela II e no Gráfico 2 verificamos que das 10 drogas antimicrobianas testadas com Escherichia coli padrão, os resultados mais alterados foram obtidos com carbenicilina, nitrofurantoina, amicacina, ampicilina e cefalotina (Tabela VI).

TABELA VI

Resultados com valores acima e abaixo dos limites de confiança

Drogas antimicrobianas	Total de antimicrobianos	Resultados fora dos limites de confiança
Carbenicilina	12	7 (58%)
Nitrofurantoina	5	2 (40%)
Amicacina	20	6 (30%)
Ampicilina	20	5 (25%)
Cefalotina	20	5 (25%)

Os resultados que se apresentaram dentro dos limites de confiança estão relacionados com colistina, estreptomicina, sulfadiazina e sulfametoxazol-trimetoprim.

As demais drogas antimicrobianas apresentaram pelo menos um resultado acima ou abaixo do intervalo de confiança.

Quanto à variação semanal, podemos observar na Tabela II e no Gráfico 2 que em cinco ocasiões, de 30 a 50% das 10 drogas antimicrobianas testadas com Escherichia coli padrão apresentaram resultados abaixo ou acima dos limites de confiança (Tabela VII).

TABELA VII

Resultados fora dos limites de confiança

Semanas da prova	Total de antimicrobianos	Resultados fora dos limites de confiança
3	10	5 (50%)
5	10	3 (30%)
14	9	3 (33%)
19	9	4 (44%)
20	10	3 (30%)

Ainda na Tabela II e no Gráfico 2, quanto à variação semanal, observamos que em apenas seis ocasiões (semanas 2, 4, 9, 12, 15 e 18) o total das drogas antimicrobianas testado com Escherichia coli padrão apresentou-se dentro do intervalo de confiança.

Na Tabela III e no Gráfico 3 podemos notar que as quatro drogas antimicrobianas testadas com Pseudomonas aeruginosa padrão apresentaram resultados fora do intervalo de confiança (Tabela VIII).

TABELA VIII

Resultados fora dos limites de confiança

Drogas antimicrobianas	Total de antimicrobianos	Resultados fora dos limites de confiança
Carbenicilina	11	6 (55%)
Colistina	20	6 (30%)
Amicacina	20	4 (20%)
Gentamicina	20	4 (20%)

Quanto à variação semanal, observamos na Tabela III e no Gráfico 3 que em apenas sete ocasiões (semanas 1, 3, 4, 6, 7, 12 e 14) os quatro antimicrobianos testados com Pseudomonas aeruginosa padrão mostraram-se dentro dos limites de confiança. Na quinta semana, todas as drogas testadas apresentaram valores acima dos limites máximos de confiança. Nas demais semanas, de 1 a 2 antimicrobianos apresentaram-se acima ou abaixo do intervalo de confiança.

4.2 - ANTIBIOGRAMAS COM DISCOS DE PROCEDÊNCIAS DIFERENTES

Os resultados obtidos com discos de diferentes firmas foram anotados nas Tabelas IX e X e transcritos para a Figura 1. Essa figura apresenta traços verticais de marcados perpendicularmente, interrompidos por linhas horizontais cheias, para os discos das firmas A, B e C (de papel)

e pontilhadas para os discos da firma D (sob forma de comprimidos), que apresentam concentrações diferentes dos demais. Essas linhas horizontais cheias e pontilhadas representam os valores máximo e mínimo dos intervalos de confiança.

Os resultados obtidos com discos de antimicrobianos de cada procedência foram representados com figuras geométricas diferentes.

Na Tabela IX e na Figura 1, verificamos que de 14 drogas antimicrobianas provenientes da firma C submetidas ao teste, 3 (21,4%), correspondentes a amicacina, ampicilina e lincomicina, apresentaram-se abaixo dos limites de confiança quando testados com cepa padrão de Staphylococcus aureus.

Quando testados com Escherichia coli padrão, 3 discos (25%), dos 12 utilizados, correspondentes a amicacina, ampicilina e carbenicilina, apresentaram-se abaixo do intervalo de confiança. Quando testados com cepa padrão de Pseudomonas aeruginosa 2 (66%) antimicrobianos dos 3 testados, correspondentes a amicacina e carbenicilina, apresentaram-se abaixo desse limite de confiança.

Dos 14 discos provenientes da firma B, 3(21,4%) correspondentes a oxacilina, penicilina e tetraciclina apresentaram resultados acima dos limites de confiança e 1 disco, de lincomicina, resultados abaixo desse limite quando testados com cepa padrão de Staphylococcus aureus. Os demais discos de antimicrobianos testados com cepas padrão de E. coli e Pseudomonas aeruginosa apresentaram-se todos dentro

dos limites de confiança.

Dos discos provenientes da firma A, apenas um, de lincomicina, apresentou resultado abaixo do intervalo de confiança quando testado com cepa padrão de Staphylococcus aureus.

Os demais discos de antimicrobianos testados com cepa padrão de E. coli e Pseudomonas aeruginosa apresentaram-se todos dentro dos limites de confiança.

Na Tabela X e na Figura 1 podemos notar que 3 dos 12 discos de antimicrobianos (25%) sob forma de comprimido, provenientes da firma D, quando testados com cepa padrão de Staphylococcus aureus, apresentaram-se abaixo dos limites de confiança. Esses discos eram de cloranfenicol, nitrofurantoina e penicilina.

Quando testados com Escherichia coli padrão 2 discos entre os 11 testados (18%) correspondentes a neomicina e cloranfenicol, apresentaram resultados abaixo do limite de confiança.

Na Tabela IX e na Figura 1 notamos ainda que os discos provenientes da firma B apresentaram, de um modo geral, diâmetros do halo de inibição de 0,5 a 7 mm superiores aos discos importados. Podemos observar também que todos os fabricantes apresentaram discos de lincomicina abaixo dos limites de confiança, com exceção do disco sob forma de comprimido apresentado pela firma D.

TABELA IX

Resultados dos antibiogramas com discos de papel de procedências diferentes (firmas A, B e C)

DISCOS DE ANTIMICROBIANOS	Concentração (µg)	Staphylococcus aureus ATCC:25923				Escherichia coli ATCC:25922				Pseudomonas aeruginosa ATCC:27853			
		Intervalo de confiança da zona (mm)	A	B	C	Intervalo de confiança da zona (mm)	A	B	C	Intervalo de confiança da zona (mm)	A	B	C
Amoxicilina	10	18-24	19	23	17	18-24	18,5	23	17	15-21	15,5	20	14
Ampicilina	10	24-35	31	32,5	10	15-20	19	20	10	---	---	---	---
Canamicina	30	19-26	23	24	21	17-25	22	23	20,5	---	---	---	---
Carbenicilina	100	---	---	---	---	14-29	24	24	10	20-24	20	20	11,5
Cefalotina	30	25-37	32,5	32	33	18-23	21	20	20	---	---	---	---
Cloranfenicol	30	19-26	24,5	25	23,5	21-27	26	27,5	24	---	---	---	---
Colistina	10	---	---	---	---	11-15	14	13	13	---	---	---	---
Eritromicina	15	22-30	25	24	25	---	---	---	---	---	---	---	---
Estreptomina	10	14-22	18,5	20	18	12-20	15	16	14	---	---	---	---
Gentamicina	10	19-27	23	24	22	19-26	21	22	21	16-21	16	16	16
Lincomicina	2	23-29	18,5	19	17,5	---	---	---	---	---	---	---	---
Neomicina	30	---	---	---	---	17-23	18	19	17,5	---	---	---	---
Novobiocina	30	22-31	26,5	28,5	26,5	---	---	---	---	---	---	---	---
Oxacilina	1	19-22	21,5	28,5	19	---	---	---	---	---	---	---	---
Penicilina	100	26-37	33,5	38	30	---	---	---	---	---	---	---	---
Sulfametoxazol- -trimetoprim	1,25 23,75	24-32	27,5	28,5	26,5	24-32	28,5	29,5	27,5	---	---	---	---
Tetraciclina	30	19-28	28,5	30	29	18-25	25	24,5	22	---	---	---	---

TABELA X

Resultado do antibiograma com discos em forma de comprimido (firma D)

COMPRIMIDOS DE ANTIMICROBIANOS	concentração (ug)	Staphylococcus aureus ATCC:25923		Escherichia coli ATCC:25922	
		limite de tolerância diâmetro da zona (mm)	halo de inibição (mm)	limite de tolerância diâmetro da zona (mm)	halo de inibição (mm)
Ampicilina	33	36-40	34	21-34	24
Canamicina	100	28-31	29	28-31	28
Cloranfenicol	120	30-40	25	30-40	29
Colistina	150	---	---	23-26	25
Eritromicina	78	30-31	33	---	---
Estreptomicina	160	25-28	30	27-31	26
Ceftamicina	40	27-30	26	28-31	28
Imconicina	19	27-31	30	---	---
Neomicina	120	---	---	25-28	24
Nitrofurantoina	260	26-28	25	28-31	30
Penicilina	8	31-37	30	---	---
Sulfadiazina	240	29-31	32	25-28	26
Sulfametoxazol- -trimetoprim	5,2 240	34-37	34	33-37	33
Tetraciclina	80	26-30	32	25-28	30

LEGENDA DA FIGURA 1

	Firmas A, B e C	Firma D	Firmas A, B e C	Firma D
AN = ampicacina	10 ug		GM = gentamicina	30 ug 40 ug
AM = ampicilina	10 ug	33 ug	L = lincomicina	2 ug 19 ug
K = canamicina	30 ug	100 ug	NE = neomicina	30 ug
CB = carbenicilina	30 ug		NB = novobiocina	30 ug
CF = cefalotina	30 ug		OX = oxacilina	1 ug
C = cloranfenicol	30 ug	150 ug	P = penicilina	10 U 8 U
Cl - colistina	10 ug	150 ug	SxT = sulfametoxazol +... trimetoprim	1,25 ug 5,2 ug 23,75 ug 240 ug
E = eritromicina	15 ug		TE = tetraciclina	30 ug 80 ug
S = estreptomicina	10 ug			

Figura 1 - Controle dos discos de drogas antimicrobianas de três firmas diferentes

Staphylococcus aureus ATCC: 25923

Escherichia coli ATCC: 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC: 27853

- Discos da firma Difco (C)
- Discos da firma Cecon (B)
- △ Discos da firma BBL (A)
- ◊ Discos da firma Rosco (D)

5 - DISCUSSÃO

Atualmente, a melhor forma de se fazer controle de qualidade da prova de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos, executada pelo método de difusão, é através do uso de cepas bacterianas padrão^{12,35,39,41}. Esta prática teve início na última década, pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo hoje recomendada pela Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica⁵¹.

O controle de qualidade feito pela FDA determinou a zona de inibição média de cada droga testada e estabeleceu os limites de tolerância para observações isoladas. Estes dados são apresentados em tabelas, que devem ser seguidas pelos laboratórios de microbiologia clínica como uma base para suas próprias determinações. Os diâmetros da zona de inibição de cada droga antimicrobiana deverão cair dentro dos limites oficiais estabelecidos, expressando assim a exatidão e a precisão do método com níveis de confiança de 90% e de tolerância de 75%.

A média observada e a variação obtida de cada droga antimicrobiana testada não deverá discordar em mais do que uma vez em cada 20 provas realizadas ($p = 0,05$)⁶⁵.

5.1 - ANTIBIOGRAMAS COM DISCOS DE MESMA PROCEDÊNCIA

Analisando os resultados de antibiogramas feitos com estirpes bacterianas padrão em 20 determinações, com intervalo médio de uma semana entre uma determinação e outra, pudemos observar que grande parte das drogas antimicro

bianas testadas apresentaram resultados fora dos limites de confiança, como podemos ver na Figura 2 que mostra a distribuição percentual dos resultados fora dos limites.

Vários autores fizeram estudos relativos ao controle de qualidade de antibiogramas^{3,13,33,39,41,62,73}.

Thornsberry e cols.⁶⁵ afirmam que embora a base de um bom programa de controle de qualidade seja o uso apropriado de estirpes bacterianas padrão, deve-se levar em conta o uso correto dos reagentes e as condições utilizadas nesta prova.

Ballows e Gavan³ apontaram determinados fatores, que interferem na prova de sensibilidade alterando o seu resultado, que são passíveis de controle. Ao lado destes fatores controláveis, existem outros, intrínsecos, que são de difícil controle, uma vez que estão relacionados com a composição do meio de cultura.

Dentre as variáveis que podem ter influido no resultado do presente estudo, vamos analisar os fatores a baixo:

5.1.1 - Quanto ao meio de cultura

a) Quanto à composição do meio de cultura

Escobar²⁶ avaliou a eficiência de vários meios de cultura freqüentemente usados como alternativos do ágar-Mueller Hinton, que é o meio oficialmente recomendado para ser utilizado nas provas de sensibilidade pelo método de Kirby-Bauer. O autor comparou meios de cultura como ágar Infusão de cérebro e coração, ágar-nutriente, ágar triptica

LEGENDA DA FIGURA 2

AN = amicacina	GM = gentamicina
AM = ampicilina	L = lincomicina
CB = carbenicilina	NF = nitrofurantoina
CF = cefalotina	NB = novobiocina
C = cloranfenicol	OX = oxacilina
Cl = colistina	P = penicilina
CN = canamicina	SD = sulfadiazina
E = eritromicina	SxT = sulfametoxazol-trimetoprim
S = estreptomicina	TE = tetraciclina

Figura 2 - Antibiograma realizado com cepas padrão utilizando discos de mesma procedência.
Distribuição percentual dos resultados que caíram fora dos limites de confiança

se-soja e base de ágar-sangue. Após avaliação estatística dos resultados, observou que o ágar-Mueller Hinton apresentou melhor reprodutibilidade dentre todos os outros e o ágar-nutriente apresentou pior reprodutibilidade.

Esser e Elefson²⁷ compararam o meio de ágar-Mueller Hinton e DST (Diagnostic Sensitivity Test) e demonstraram que os dois meios são adequados para a prova de sensibilidade pois apresentaram resultados bastante reprodutíveis.

Brenner e Sherris¹⁵ compararam diferentes lotes de ágar-Mueller Hinton e ao testar Staphylococcus aureus com sulfametoxazol, obtiveram variações significativas, mas quando testaram Escherichia coli esta alteração não foi evidente.

Barry e Effinger⁵ constataram variações acentuadas ao testar ágar-Mueller Hinton de três procedências diferentes. Os testes realizados com cepa padrão de Escherichia coli, demonstraram que a baixa reprodutibilidade foi mais acentuada com lotes de meios de cultura de diferentes procedências do que com lotes de um só fabricante.

Brenner e Sherris¹⁵ obtiveram resultados satisfatórios quando utilizaram diferentes lotes de ágar-Mueller Hinton de uma só procedência. Os autores sugeriram que é perfeitamente possível a fabricação de meios consistentemente reprodutíveis se forem seguidos critérios rígidos quanto a sua preparação.

Lawrence e Haeprich⁴⁴ demonstraram que variações no ágar podem produzir halos maiores ou menores com as

clortetraciclinas, testadas com Staphylococcus aureus. A lavagem desse ágar levou a uma redução, mas não à eliminação, desse efeito³⁷.

Kunion e Edmondson⁴³ demonstraram que a maioria dos constituintes do ágar são do grupo sulfato, sendo os maiores responsáveis pela formação de pequenas zonas de inibição observadas com polimixinas e aminoglicosídeos.

A atividade das tetraciclinas também é influenciada pela concentração dos cátions bivalentes livres (Ca^{++} e Mg^{++}), que complexam estes antibióticos¹⁵. Outros antibióticos como canamicina, neomicina, polimixina B e estreptomina também sofrem efeitos adversos do ágar⁴³.

Embora o ágar-Mueller Hinton seja o meio oficialmente adotado e recomendado pela Organização Mundial de Saúde e amplamente utilizado para a realização das provas de sensibilidade, não apresenta quantidades definidas de determinados íons bivalentes como Mg^{++} e Ca^{++} ³⁴, levando a alteração de resultados, principalmente com Pseudomonas aeruginosa, em relação a antibióticos aminoglicosídeos^{55,56, 58,70}.

Reller e cols.⁵⁶ compararam diferentes lotes de ágar-Mueller Hinton e caldo-Mueller Hinton de um mesmo fabricante e verificaram que todos apresentavam concentrações diferentes destes cátions.

Traub⁶⁶ constatou que aumentando a concentração de íons magnésio no meio de ágar-Mueller Hinton, havia um aumento substancial da resistência de Pseudomonas aeruginosa quando testada com gentamicina, o que confirma as

observações de Garrod e Waterworth³⁴, que já tinham constatado este fato com polimixinas e outros aminoglicosídeos.

O antagonismo específico da colistina pelo Cálcio foi verificado por Davis e cols.¹⁹ através da adição de CaCl_2 no meio de cultura.

Pollock e cols.⁵⁵ também demonstraram variações nos resultados do antibiograma ao testar gentamicina com vários lotes de ágar e caldo-Mueller Hinton, tanto na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) como na prova de difusão com disco, utilizando 8 cepas de Pseudomonas aeruginosa provenientes de material clínico e com uma cepa padrão. Tais variações poderiam atribuir a estes microrganismos uma falsa sensibilidade quando testados com lotes de ágar-Mueller Hinton com baixos teores de Mg^{++} e Ca^{++} ou uma falsa resistência com altos teores destes cátions bivalentes. A concentração ideal destes íons é de 20 a 25 mg de Mg^{++} e de 50 a 100 mg de Ca^{++} por litro de meio de cultura⁵⁶.

Segundo Zimelis e Jackson⁷⁵ o aumento da resistência de estirpes de Pseudomonas aeruginosa a polimixinas e aminoglicosídeos na presença de concentrações elevadas de Ca^{++} e Mg^{++} é devido à propriedade particular deste microrganismo e não devido a inativação do antibiótico. Para esses autores, parece existir uma interação desses dois cátions bivalentes num sítio exterior à membrana bacteriana, ao nível da parede celular ou entre a parede e a membrana.

Arvidson e cols.² observaram que a esterilização prolongada coloca em risco a qualidade do meio de cultura

ra, principalmente em relação à formação de fosfatos complexos, que reduzem a quantidade de cátions bivalentes biologicamente disponíveis. Esta alteração pode distorcer o resultado da prova de sensibilidade principalmente em se tratando de aminoglicosídeos e tetraciclinas.

Segundo Washington⁶⁸ a cepa de Pseudomonas aeruginosa ATCC: 27853, normalmente utilizada para controlar a qualidade do teste, detecta somente problemas gerais relacionados ao meio de cultura, concentração de drogas no disco, quantidade de bactérias viáveis no inóculo, mas esta cepa padrão é relativamente insensível aos componentes dos meios de cultura que influem na atividade dos aminoglicosídeos.

Reller e cols.⁵⁶ sugeriram uma seleção de estirpes de Pseudomonas aeruginosa que servisse de padrão para detectar também problemas relacionados a íons bivalentes.

Minschew e cols.⁴⁷ sugeriram a aplicação de um limite intermediário não fixo, que fosse dependente da cepa padrão de Pseudomonas aeruginosa utilizada no controle de qualidade. Woolfrey e cols.⁷², no entanto, observaram que a adoção deste critério levaria a erros maiores, por ser subjetivo.

Vários autores^{47,68,71} são unânimes em afirmar que em relação a Pseudomonas aeruginosa e aminoglicosídeos o ágar-Mueller Hinton não pode ser considerado um meio de cultura de referência para ser utilizado na prova de sensibilidade, devido à presença de determinados componentes indefinidos como ágar utilizado, a concentração dos cátions bi

valentes e a qualidade das peptonas.

Muitos ressaltam a necessidade de se chegar à fórmula de um meio de cultura ideal^{24,34,44,55}.

Lawrence e Haeprich⁴⁴ propuseram um meio totalmente sintético, substituindo o ágar por polímeros lineares de polioxietileno, biologicamente inerte, e as peptonas por aminoácidos. Segundo os autores, esse meio proposto, além de permitir a difusão de agentes antimicrobianos, garantiria a reprodutibilidade da prova. Esse meio de cultura é dispendioso não sendo comercializado. Até o momento não surgiu a solução, a nível de laboratório clínico, para os problemas associados à composição do ágar-Mueller Hinton.

Os dados da literatura são bastante consistentes quando se referem à influência dos componentes do meio de cultura no resultado do antibiograma.

No presente estudo a influência do meio de cultura com Pseudomonas aeruginosa em relação a colistina (polimixina E) parece evidente, pois esta droga apresentou 30% dos resultados fora dos limites de confiança, quando testada com cepa padrão daquela bactéria. No entanto, quando testada com cepa padrão de Escherichia coli, essa droga apresentou-se sempre dentro dos limites de confiança (Tabelas II e III).

Pode-se notar ainda, no Gráfico 3, que a maioria dos resultados apresentados por colistina está localizada acima do limite superior permitido, o que nos leva a concluir que a quantidade de Ca^{++} e Mg^{++} do meio de cultura poderiam estar em concentrações insuficientes.

As mesmas considerações já não poderíamos fazer em relação aos aminoglicosídeos testados como gentamicina e amicacina, pois estas drogas apresentaram resultados fora dos limites de confiança também com outros microrganismos padrão utilizados, podendo ter sofrido influência de outras variáveis, além do próprio meio de cultura.

Quanto aos demais antimicrobianos testados, canamicina, neomicina e estreptomicina, que poderiam ter sofrido efeitos adversos dos componentes do meio, salientados por alguns autores³⁷, não apresentaram alterações significativas.

b) Quanto ao pH do meio de cultura

O pH do meio de cultura, tanto em meio sólido como em caldo, pode alterar consideravelmente o diâmetro da zona de inibição ou a concentração inibitória mínima.

O halo de inibição depende da influência do pH na atividade de cada droga. Drogas antimicrobianas como tetraciclinas e ácido nalidíxico são mais ativas em pH ácido. Por outro lado, antibióticos como eritromicina, lincomicina e aminoglicosídeos são mais ativos em pH alcalino. Se o pH do meio de cultura encontrar-se fora dos limites recomendados ($7,3 \pm 0,1$), pode ocorrer variação de até 6 mm no diâmetro da zona de inibição. Em provas de diluições o pH pode causar efeito semelhante, aumentando ou diminuindo a concentração inibitória mínima de 4 a 8 vezes. Este efeito é suficiente para causar grandes alterações nos resultados⁹.

No presente trabalho o pH foi inicialmente ajustado e não parece ter influido, já que os resultados não

mostraram alterações evidentes com as drogas antimicrobianas mencionadas pelos autores⁹.

Podemos notar na Figura 2 que a tetraciclina apresentou apenas um resultado fora dos limites em 20 testes realizados (discordância de 5%). Pelos Gráficos 1 e 2 podemos observar que a maioria dos demais antimicrobianos manteve-se dentro do intervalo de confiança na ocasião em que o resultado da tetraciclina apresentou-se fora desses limites permitidos.

5.1.2 - Quanto à espessura do ágar

Vários autores^{6,24,55}, estudando o efeito da espessura do ágar na prova de sensibilidade, constataram variações no resultado de antibiogramas realizados em meios de cultura com espessuras variadas.

Barry e Fay⁶ verificaram que o diâmetro da zona de inibição tende a aumentar quando há diminuição da espessura do ágar, ocorrendo o inverso em alguns casos. As maiores alterações observadas pelos autores ocorreram com cefalotinas, penicilina e eritromicina.

No caso do cloranfenicol, houve redução do tamanho da zona com o aumento da espessura do ágar e no caso da tetraciclina o diâmetro da zona de inibição manteve-se inalterado em espessuras de 2 a 8 mm²⁴.

Utilizando-se placas com pouco meio de cultura, qualquer inclinação do ágar provoca mudanças drásticas no resultado da prova, enquanto que em volumes maiores este efeito torna-se quase insignificante⁶.

Segundo Ericson e Sherris²⁴ a espessura ideal do ágar é de aproximadamente 4 mm, que é a recomendada pelo método de referência internacional.

Woolfrey e cols.⁷² alertam sobre a distorção existente em placas de plástico, muito utilizadas atualmente, e que a concavidade destas placas é uma fonte em potencial de erro quando se utiliza o método de difusão em ágar. Tais concavidades podem levar à formação de zonas de inibição mais estreitas próximo à periferia da placa, devido ao aumento da espessura do ágar, e formação de zonas mais largas em direção ao centro da placa, devido à diminuição da espessura do ágar.

No presente estudo não se notou o efeito da espessura do ágar, pois utilizamos placas de fundo chato e distribuidores automáticos de meio de cultura, o que mantinha esse fator constante.

5.1.3 - Quanto ao inóculo

O inóculo é um dos fatores mais importantes que influem na variação dos resultados obtidos diariamente na prova de sensibilidade. Existe uma relação inversa: quanto maior a quantidade de microrganismo no inóculo menor a zona de inibição.

Linton⁴⁶ observou que a falta de reprodutibilidade é na maioria das vezes devida à falta de padronização adequada do inóculo, pois quando este é controlado pode-se obter resultados reprodutíveis.

A turbidez da suspensão bacteriana padroniza-

da para inóculo, utilizado no método de Kirby e Bauer é conseguida através da comparação com a turvação correspondente à metade do tubo nº 1 da escala de Mac Farland, equivalente a 10^8 bactérias por mL de inóculo.

Segundo Linton⁴⁶ esta turvação produzida pela suspensão bacteriana poderia ser ajustada também através da nefelometria.

De acordo com as regras propostas pelo FDA (Food and Drug Administration) e do NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standart) este padrão de sulfato de bário (escala de Mac Farland) deveria ser preparado a cada 6 meses.

Washington e cols.⁶⁹ verificaram, entretanto, que esta solução mantem-se estável por vários anos quando acondicionada em frasco ampola de vidro ermeticamente fechado e conservado num ambiente escuro a temperatura ambiente.

Pela Tabela I, analisando a variação semanal dos antibiogramas realizados com cepa padrão de S. aureus, notamos que em duas ocasiões (semanas 10 e 16) os antimicrobianos utilizados apresentaram 50 a 54% dos discos com resultados abaixo dos limites de segurança. Na Tabela II, analisando a variação semanal dos antibiogramas realizados com cepa padrão de Escherichia coli, em três ocasiões (semanas 3, 5 e 19) as drogas testadas apresentaram de 30 a 50% dos discos com resultados acima dos limites de segurança.

Estes resultados evidenciam a influência do inóculo, mostrando-se excessivo no primeiro caso e insuficiente no segundo.

5.1.4 - Quanto às condições de incubação

As condições em que as placas são incubadas podem alterar o resultado das provas.

Uma atmosfera de CO₂ pode alterar a atividade de vários antimicrobianos. A tetraciclina, por exemplo, é mais ativa em atmosfera de 10% de CO₂ do que em atmosfera comum. Já com respeito à estreptomicina, à canamicina e à eritromicina, ocorre o inverso, isto é, os halos são maiores em atmosfera comum. Em anaerobiose, os aminoglicosídeos em geral formam halos de inibição extremamente reduzidos. O mecanismo da influência da anaerobiose não foi ainda bem esclarecido⁵⁷.

Este parâmetro manteve-se constante no presente estudo, já que as placas foram incubadas em aerobiose.

A temperatura de incubação normalmente utilizada em estudos bacteriológicos em laboratórios de rotina está em torno de 36°C.

O método padronizado por Kirby e Bauer preconiza a temperatura de 35°C¹⁰. Vários autores^{20,38,63,64} constataram que à 37°C a resistência de Staphylococcus aureus heteroresistentes a determinados antibióticos como metilicilina, oxacilina ou nafcilina são imperceptíveis, levando a erro.

Temperaturas abaixo de 35°C podem comprometer o resultado da prova, uma vez que a maioria dos antimicrobianos difundem-se mais lentamente em temperaturas mais baixas, em parte devido ao aumento da viscosidade do meio.

Cooper e cols.¹⁸ verificaram que incubando-se placas em pilhas de 5, a placa central atingia a temperatura da estufa num intervalo de tempo 4 vezes maior do que o necessário para uma placa isolada.

Em laboratórios com grande número de exames o empilhamento das placas torna-se comum, em razão da economia de espaço, o que torna este problema muito freqüente.

O tempo de incubação padronizado pelo método de Kirby-Bauer é de 16 a 18 horas.

Muitas vezes, em situações de emergência clínica, somos solicitados a apressar o exame, abreviando o período de incubação. Isto pode levar a erros.

Kluge⁴⁰ estudou antibiogramas através do método de Kirby e Bauer, utilizando somente enterobactérias, com períodos de incubação de 4, 8 e 12 horas, confirmando a leitura após 18 horas.

Com 4 horas de incubação houve concordância de resultados em 87% das provas, seguida de 94% em 8 horas e 96% em 12 horas. Estes resultados foram encontrados também por Barry⁸ quando obteve 90% de concordância em incubação de 5 a 6 horas.

Apesar da boa concordância apresentada, estes tempos de incubação não podem ser adotados na rotina de laboratório em substituição ao preconizado por Kirby e Bauer, devido a certas discrepâncias encontradas com várias cepas bacterianas, entre outras Proteus sp, Serratia sp e Enterobacter sp⁴⁰.

Estes tempos de incubação podem ser úteis em casos onde há urgência na escolha do antimicrobiano apropriado para o tratamento de paciente com séria infecção bacteriana, desde que o resultado final seja confirmado após leituras de 16 a 18 horas de incubação.

5.1.5 - Quanto aos discos de drogas antimicrobianas

Dentre as numerosas variáveis que alteram os resultados de um antibiograma, os discos de drogas antimicrobianas constituem um dos fatores que mais se relacionam com a falta de exatidão e baixa reprodutibilidade nas provas de sensibilidade feitas em rotina de laboratório^{10,24,33}.

a) Influência do papel de filtro na eficiência dos discos de drogas antimicrobianas

Vários estudos foram feitos quanto a possível influência dos diversos papéis de filtro na atuação dos discos de drogas antimicrobianas^{42,51,52,53}.

Kramer e Kirshbaum⁴² verificaram que não havia diferença significativa nos resultados obtidos com discos de drogas antimicrobianas feitos com diferentes lotes de papel de filtro de vários fabricantes, desde que estes papéis se enquadrassem nas especificações do FDA (Food and Drug Administration).

Esse órgão Federal²⁸ especifica o uso de papel de filtro branco, com diâmetro de 1/4 de polegada (6,35 mm), com peso de 30 mg/cm² que deverá absorver aproximadamente 3 vezes o seu peso de água destilada.

Os autores verificaram ainda que a diferença

nos resultados obtidos com discos de drogas antimicrobianas feitos com papéis de filtro diferentes daqueles especificados pelo FDA apresentavam acentuadas diferenças nos resultados da prova.

Ostrander e Griffith⁵³ alertaram sobre as tintas e os corantes utilizados para codificar os discos de drogas antimicrobianas, que poderiam impedir a absorção uniforme da solução da droga, além de prejudicar ou potencializar a atividade da mesma ou ainda formar substâncias complexas menos difusíveis.

Assim, o papel de filtro ideal utilizado no preparo dos discos deve ter espessura uniforme, não conter substâncias capazes de inibir crescimento da bactéria e, ainda, permitir a liberação regular da droga antimicrobiana.

Como o preparo de discos envolve uma tecnologia bastante elaborada, dava-se preferência aos discos fornecidos por representantes de firmas sediadas em países que, através de órgãos competentes, certificam as características dos mesmos, incluindo a data de vencimento.

Até há pouco tempo vários laboratórios clínicos preparavam seus próprios discos, sem levar em conta o rigor das diversas fases, o que seguramente conduzia a erros grosseiros.

Atualmente, além de discos importados, existem disponíveis no comércio discos de fabricação nacional, com várias apresentações. Sua qualidade, contudo, é discutível, ficando a critério do próprio consumidor comprovar a eficiência desse material, uma vez que não há a mínima fiscalização.

b) Potência dos discos

A quantidade de cada antimicrobiano num disco deve ser suficiente para permitir uma concentração no ágar que reproduza a maior concentração atingida por esse agente no local da infecção. Os diâmetros das zonas de inibição não devem exceder de 40 mm, sendo geralmente menores do que 50 mm, com os microrganismos altamente sensíveis.

Não é mais recomendado o uso de discos com médias ou baixas concentrações de antimicrobianos, dada a falta de uniformização dos resultados¹⁰.

A potência considerada satisfatória especificada pela Organização Mundial de Saúde é de 75 a 135% do valor declarado no rótulo, limite esse um pouco mais rigoroso do que o especificado pelo FDA (Food and Drug Administration) de 67 a 150%^{29,51}.

Segundo o FDA, os critérios sobre a uniformidade da concentração são especificados e revistos pelas autoridades nacionais de controle. Como medida conveniente de uniformidade durante o processo de fabricação, 90% dos discos examinados ao acaso devem se enquadrar dentro da variação de 2,5 mm de halo⁵¹.

A potência real de antimicrobianos no disco é a grande responsável pela falta de reprodutibilidade e exatidão nas provas de sensibilidade.

O único país que, até 1975, apresentava rigorosa fiscalização através de órgãos oficiais, quanto ao limite de variação permitido na potência das drogas impregna

das em discos eram os Estados Unidos da América. Devido a esta fiscalização, houve crescente melhora na qualidade das provas de sensibilidade feitas naquele país¹⁶.

Em 1958 o FDA daquele país constatava que 44 a 100% dos discos produzidos apresentavam resultados fora dos limites estabelecidos. Em 1961 esta taxa diminuiu para 35,7%. Após a instituição do regulamento que obrigava controle rígido de qualidade na fabricação dos discos de drogas antimicrobianas sob a vigilância e a certificação daquele órgão oficial, este percentual declinou para 4,7% em 1972. Esta mudança refletiu melhoras significativas sobre a situação existente antes deste regulamento, representando também o reconhecimento por parte dos fabricantes, da necessidade de um programa de controle de qualidade rígido. Estes melhoramentos foram reconhecidos internacionalmente e a qualidade dos discos produzidos nos Estados Unidos da América hoje em dia é praticamente inquestionável^{60,73}.

c) Conservação dos discos

Griffith e Mullins³⁶ estudando a estabilidade dos discos de penicilina G, metecilina, oxacilina e cefalotina, sob diferentes condições de temperatura e umidade, constataram que a umidade é o fator mais agravante na inativação da droga, pois discos mantidos sob dessecação sofriam pouca ou nenhuma alteração mesmo em temperaturas de 37°C a 56°C, durante 5 dias. Em ambiente com umidade relativa elevada, estas drogas foram completamente inativadas neste período.

A estabilidade máxima das drogas foram obtidas à temperatura de -20°C , sob dessecação e vácuo, comprovada com ensaios repetidos durante um período de 3 anos, provando ser um ótimo método de conservação, principalmente para antibióticos lábeis como penicilinas e seus derivados semisintéticos. Para a maioria das outras drogas testadas a conservação na geladeira foi suficiente. Discos de sulfonamidas e polimixinas foram estáveis sob diversas condições de conservação²⁴.

A prevenção contra umidade é um cuidado que não deve ser negligenciado, pois trata-se de um fator que influi acentuadamente na queda da potência, induzindo a erros e a falta de reprodutibilidade dos resultados. Assim, é fundamental o armazenamento dos discos em frascos ermeticamente fechados, contendo substâncias dessecantes, a 4°C ou menos.

Um descuido que é freqüentemente notado em laboratórios de rotina é a conservação inadequada dos discos, em distribuidores semiautomáticos. Depois que os invólucros individuais são colocados no distribuidor, os discos são em geral negligenciados, sofrendo influência direta de variações de temperatura e principalmente de umidade. Este fato foi descrito também por Griffith e Mullins³⁶.

Outro fator a ser considerado é quanto ao invólucro contendo os discos. Quando retirados do congelador ou da geladeira, o invólucro deve aguardar de 1 a 2 horas até que atinja a temperatura ambiente para ser então aberto. Caso contrário, a condensação de vapor de água sobre os discos virá forçosamente acelerar a inativação da droga antimicrobiana²⁴.

Os resultados de controle de qualidade de an tibiógrama apresentados no presente trabalho mostraram que a lincomicina teve o maior índice de resultados fora dos li mites (95%). Houve apenas um resultado dentro da faixa de confiança nos 20 testes realizados, como pode ser verificado na Figura 2.

Observamos ainda que as drogas pertencentes ao grupo das penicilinas semi-sintéticas (oxacilinas, carbenicilina, cefalospotina e ampicilina) e a penicilina natural (penicilina G), quando testadas com cepas de bactérias pa drão, apresentaram com maior frequência resultados com valo res abaixo dos limites de confiança.

Assim, 60% das oxacilinas (Tabela I), 45 a 58% das carbenicilinas (Tabelas II e III), 25% da penicilina G (Tabela I), 25% das cefalosporinas (Tabela II) e 25% das am picilinas (Tabela II), apresentaram resultados adversos.

Dentre os derivados da penicilina resistentes à penicilinase, a oxacilina é a droga de eleição para as provas de sensibilidade por ser mais resistente às varia ções de temperatura e umidade.

No presente estudo a oxacilina apresentou re sultados bastante alterados, o que comprova a labilidade tam bém desta droga.

Pela Tabela I verificamos ausência de halos de inibição com discos de sulfadiazina e de sulfametoxazol-tri metoprim, em duas ocasiões diferentes, possivelmente cau sadas pela perda completa de atividade destas drogas nos in vólucros usados naqueles dias.

5.1.6 - Quanto à leitura dos halos de inibição

Normalmente, a leitura dos halos de inibição é feita com régua ou paquímetro. A leitura é realizada por transparência, pelo fundo da placa, mantendo-se a mesma altura da vista do observador, a uns 20 cm dele, para evitar problemas de paralaxe.

O halo se apresenta como uma zona clara onde não se visualiza crescimento de microrganismos. A observação é facilitada pelo exame da superfície do meio de cultura por meio de luz refletida, contra um fundo escuro e opaco, situado a 5 ou 7 cm. Quando feita com luz transmitida pode resultar em medidas diferentes das reais, dependendo da intensidade da luz. Não devem ser usadas lentes, pois a ampliação faz com que a zona pareça menor⁹.

Barry e cols.⁴ comparando os dois sistemas de incidência luminosa: refletida (pelo fundo da placa) e transmitida (através da placa, contra a luz), observaram que a diferença entre os sistemas era mínima, ao redor de ± 2 mm em 96% dos 85 testes realizados em triplicata. A maior diferença foi observada com luz refletida mas a reprodutibilidade em testes realizados em vários laboratórios foi maior com luz refletida do que com transmitida.

No caso das sulfonamidas e de sulfametoxazol-trimetoprim, há várias gerações de crescimento dos microrganismos antes da inibição pelas drogas. Desta forma, observa-se sistematicamente crescimento parcial (inibição de 80%), que é ignorado, medindo-se o diâmetro do halo que apresentar margem nítida, separando o denso crescimento dos germes da placa.

No caso de provas com Proteus mirabilis ou Proteus vulgaris, a formação do véu é também igualmente desprezada, medindo-se a margem do crescimento denso²⁹.

Barry e cols.⁷ e Anderson¹ propuseram um método que modifica a técnica de semeadura do inóculo preconizada por Kirby e Bauer, para evitar problemas de leitura apresentados com determinadas drogas ou cepas bacterianas. Neste método proposto pelos autores, ao invés de fazer o inóculo diretamente na superfície do ágar a suspensão é feita num ágar-fundido e despejado sobre a placa que já contém uma camada de ágar-Mueller Hinton solidificado. Segundo os autores⁷, além de evitar problemas de leituras com sulfonamidas e a interpretação do halo devido ao crescimento de véu, no caso de Proteus sp, ainda tornava o halo de inibição muito mais nítido e definido, facilitando a leitura.

No entanto, o método descrito torna a rotina muito trabalhosa.

5.1.7 - Quanto a avaliação do sistema utilizado para controlar a qualidade do antibiograma

Dos vários sistemas para avaliar os resultados do controle de qualidade da prova de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos existentes, o método dos gráficos pareceu-nos o mais simples e mais prático para avaliação diária ou semanal dos antibiogramas realizados, sem haver necessidade de recorrer a cálculos estatísticos trabalhosos para verificar se os resultados das provas estão confiáveis.

Alguns autores⁵ são de opinião de que cada

laboratório deveria acumular os dados de controle de qualidade e calcular seus próprios limites de controle, que deveria cair dentro dos intervalos de confiança sugeridos pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos da América e que cada novo lote de ágar-Mueller Hinton deveria ser confrontado para se ter certeza de que os limites de controle estabelecidos previamente com o lote anterior ainda seria aplicável.

Assim, no presente estudo, também foram feitos cálculos estatísticos dos dados acumulados de controle de qualidade, determinando-se a média e o desvio padrão de cada droga testada frente a cada microrganismo padrão utilizado, comparando a média e o desvio padrão teórico, que corresponde ao intervalo de confiança sugerido pelo FDA e a média e o desvio padrão obtido, que corresponde ao intervalo construído com os dados obtidos do controle de qualidade semanal.

Determinadas drogas como carbenicilina, nitrofurantoina, sulfadiazina e sulfametoxazol + trimetoprim foram testadas em número menor que 20 vezes, por dificuldades administrativas encontradas na continuação do fornecimento das mesmas, durante o período em que as provas foram executadas. Desta forma, os cálculos estatísticos realizados para estes antimicrobianos podem não refletir informações reais.

Assim, a Tabela XI apresenta o intervalo teórico, o intervalo obtido, a diferença das médias e a percentagem

TABELA XI

Intervalos de confiança teórico, obtido, diferença das médias e percentual de concordância das drogas testadas com os limites de confiança teórico

ANTIMICROBIANOS	Escherichia coli ATCC:25922				Staphylococcus aureus ATCC:29923				Pseudomonas aeruginosa ATCC:27853			
	média teórica ± D.P.	média obtida ± D.P.	diferença das médias	% de concordância	média teórica ± D.P.	média obtida ± D.P.	diferença das médias	% de concordância	média teórica ± D.P.	média obtida ± D.P.	diferença das médias	% de concordância
Amicacina	21,0 ± 3	18,0 ± 2	-3	(70)	21,0 ± 3	18,8 ± 1,5	-2,2	(90)	18,5 ± 3,5	17,2 ± 2,5	-1,3	(80)
Ampicilina	17,5 ± 2,5	18,5 ± 3	+1	(75)	29,5 ± 5,5	27,6 ± 4	-1,9	(95)	—	—	—	—
Canamicina	21,0 ± 4	20,5 ± 2	-0,5	(100)	22,5 ± 3,5	21,7 ± 2	-0,8	(90)	—	—	—	—
Carbenicilina	26,5 ± 2,5	24,0 ± 3,5	-2,5	(42)	—	—	—	—	22,0 ± 2	20,7 ± 4	-2,7	(45)
Cefalosporina	20,5 ± 2,5	19,2 ± 2,5	-1,3	(75)	31,0 ± 6	29,2 ± 4	-1,8	(95)	—	—	—	—
Cloranfenicol	24,0 ± 3	25,1 ± 2	+1,1	(85)	22,5 ± 3,5	21,5 ± 2	-1	(90)	—	—	—	—
Colistina	13,0 ± 2	12,7 ± 1	-0,3	(100)	—	—	—	—	13,0 ± 2	13,8 ± 2	+0,8	(70)
Eritromicina	—	—	—	—	26,0 ± 4	23,5 ± 3	-2,5	(75)	—	—	—	—
Estreptomicina	16,0 ± 4	16,6 ± 1,4	+0,6	(100)	18,0 ± 4	17,1 ± 2	-1,1	(95)	—	—	—	—
Gentamicina	22,5 ± 3,5	20,5 ± 2	-2	(95)	23,0 ± 4	20,8 ± 2	-2,2	(90)	18,5 ± 2,5	19,0 ± 3	+0,5	(80)
Lincomicina	—	—	—	—	26,0 ± 3	18,8 ± 3,5	-7,2	(5)	—	—	—	—
Nitrofurantoina	23,5 ± 2,5	20,8 ± 1	-2,7	(60)	22,0 ± 2	21,3 ± 2	-1,3	(75)	—	—	—	—
Novobiocina	—	—	—	—	26,5 ± 4,5	26,2 ± 3	-0,3	(95)	—	—	—	—
Oxacilina	—	—	—	—	23,5 ± 2,5	18,2 ± 2,5	-5,3	(40)	—	—	—	—
Penicilina	—	—	—	—	31,5 ± 5,5	27,1 ± 5	-4,4	(75)	—	—	—	—
Sulfadiazina	22,0 ± 4	21,0 ± 1	-1	(100)	29,0 ± 5	22,8 ± 8,5	-6,2	(78)	—	—	—	—
Sulfametoxazol-trimetoprim	28,0 ± 4	25,8 ± 1	-2,2	(100)	28,0 ± 4	27,2 ± 1	-1,2	(90)	—	—	—	—
Tetraciclina	21,5 ± 3,5	22,3 ± 2	+0,8	(95)	23,5 ± 4,5	23,2 ± 1	-0,3	(95)	—	—	—	—

D.P. = desvio padrão

tagem de concordância dos valores obtidos em relação ao intervalo de confiança teórico das drogas antimicrobianas testadas..

Ainda na Tabela XI podemos verificar que a maioria dos discos de antimicrobianos testados apresentou diâmetro do halo de inibição com média e desvio padrão abaixo daqueles estabelecidos pelo FDA.

5.2 - ANTIBIOGRAMAS COM DISCOS DE PROCEDÊNCIAS DIFERENTES

Nas Tabelas IX e X podemos comparar os resultados de antibiogramas obtidos com discos de procedências diferentes. Podemos verificar que os discos provenientes da firma C apresentaram maior número de provas abaixo dos limites de confiança. Como no país de origem esses discos são tradicionais, amplamente usados e controlados, podemos deduzir que os mesmos chegam alterados no laboratório de microbiologia clínica.

Na Figura 1 podemos verificar que os discos dessa firma apresentaram baixa atividade com os derivados semi-sintéticos da penicilina, como a carbenicilina e amplicilina.

Quanto à oxacilina, apresentou resultados dentro do intervalo de confiança. Quanto à amicacina, foi o único aminoglicosídeo entre outros testados que apresentou resultado abaixo dos limites de confiança, embora sejam considerados relativamente estáveis a mudanças de temperatura e umidade.

Os discos provenientes das firmas A, B e C apresentaram-se fora dos limites de confiança com lincomici-

na. Esta droga em todos os nossos experimentos apresentou-se abaixo dos limites de confiança. Na literatura consultada , no entanto, nenhum autor faz menção sobre problemas de conservação com esse antibiótico.

Os discos provenientes da firma A apresentaram-se dentro dos limites de confiança, quando testados com as três cepas bacterianas padrão, exceto a lincomicina.

Os discos provenientes da firma B, correspondentes a oxacilina, penicilina e tetraciclina, apresentaram-se acima do intervalo de confiança. Na Figura 1 ainda notamos que os discos desta firma mostraram halos de inibição de 0,5 a 7 mm maiores que os apresentados pelos discos importados. Este fato deve-se provavelmente à maior impregnação de drogas naqueles discos que se apresentaram acima dos limites permitidos. Para aqueles que se mantiveram dentro do intervalo de confiança, deve-se possivelmente à melhor preservação destes discos que são produzidos localmente e rapidamente usados.

Não podemos deduzir o comportamento desses discos se forem exportados para outros países, ou mesmo se usados em regiões distantes do local de fabricação.

Brown e Kothari¹⁶, comparando discos de antibióticos de diferentes procedências, notaram também que os produzidos em seu país apresentaram halos de inibição maiores que os importados. Estes autores relacionaram o achado a diferentes métodos utilizados pelos fabricantes na dosagem das drogas, além da maior impregnação destas nos discos para compensar a perda de atividade durante o uso, principalmente da

queles contendo penicilinas e derivados.

Em vista da falta de estabilidade apresentada por drogas impregnadas em discos de papel de filtro, foi sugerido o uso de comprimidos impregnados por antimicrobianos¹⁷. A estabilidade destes comprimidos deve-se à fabricação por meio de processo seco, onde os cristais das substâncias ativas são misturados com grânulos inertes, que lhes servem de suporte e de proteção.

A concentração dos antimicrobianos nestes comprimidos é muito maior do que a encontrada nos discos de papel correspondentes (cerca de 100 vezes para alguns antimicrobianos). Assim, a zona de inibição de acordo com o fabricante (não referendada pelos órgãos oficiais) é bem maior do que a formada com discos padronizados.

Brown e Kothari¹⁷, comparando a estabilidade dos comprimidos com a dos discos padronizados, notaram que os últimos perdem atividade completa dentro de 20 dias, à temperatura ambiente, enquanto que em comprimido a atividade mantém-se inalterada durante pelo menos 50 dias. Segundo o fabricante a garantia de estabilidade destes discos em forma de comprimido à temperatura ambiente é de 3 anos, com exceção da carbenicilina que deverá ser armazenada em geladeira.

Devido à disponibilidade desses comprimidos no comércio, eles também foram submetidos ao teste, juntamente com os discos padronizados, no presente trabalho.

Na Tabela X podemos verificar que três discos (25%) de 12 testados apresentaram resultados abaixo dos li

mites de confiança, correspondendo a drogas como cloranfenicol, nitrofurantoina e penicilina, quando testados com cepa padrão de Staphylococcus aureus.

Com Escherichia coli padrão, 2 discos (18%) de 11 testados, correspondentes ao cloranfenicol e à neomicina, apresentaram resultados abaixo dos limites de confiança.

A cepa padrão de Pseudomonas aeruginosa não foi utilizada para testar esses comprimidos, pela falta de disponibilidade dos intervalos de confiança estabelecidos para esta bactéria.

As dificuldades encontradas durante a manipulação dos comprimidos foram muitas, diminuindo a praticidade do seu uso.

Quando aplicados na superfície do meio inoculado, os comprimidos devem ser pressionados o suficiente para se obter um perfeito contacto. Essa pressão por vezes acarreta a destruição do disco devido à sua fragilidade. Quanto ao halo de inibição formado, que normalmente atinge mais que o dobro do diâmetro apresentado pelos discos de papel faz com que haja necessidade de número maior de placas, acarretando maior despesa em placas, de meio de cultura e mão de obra.

Fabius e cols.³⁰ comparando o uso de comprimidos com o de discos de papel, através de métodos estatísticos (curva de regressão), observaram que os valores calculados indicaram superioridade dos discos de papel, ressaltando a falta de linearidade da linha de regressão, no caso dos comprimidos quando se relacionava o tamanho da zona de ini

bição e a concentração inibitória mínima (CIM), uma vez que as concentrações de drogas nestes comprimidos eram muito altas.

Vários autores continuam estudando a melhor estabilidade das drogas antimicrobianas impregnadas em discos de papel. Pfeiffer e cols.⁵⁴ notaram que antibióticos na forma cristalina são mais estáveis à temperatura ambiente do que na forma amorfa como normalmente são impregnados nos discos de papel de filtro e que a estabilidade dos compostos cristalinos é devida a menor exposição da sua superfície e maior estabilidade termodinâmica em relação ao estado amorfo.

6 - CONCLUSÕES

Pelo desenvolvimento da tecnologia empregada e pelos resultados obtidos, podemos chegar às seguintes conclusões:

1 - Os antibiogramas feitos com Staphylococcus aureus ATCC: 25923 utilizando drogas antimicrobianas de uma única procedência revelaram maior alteração para lincomicina, oxacilina, eritromicina, nitrofurantoina, penicilina e sulfadiazina.

2 - Os antibiogramas feitos com Escherichia coli ATCC: 25922 utilizando drogas antimicrobianas de uma única procedência revelaram maior alteração com carbenicilina, nitrofurantoina, amicacina, ampicilina e cefalotina.

3 - Os antibiogramas feitos com Pseudomonas aeruginosa ATCC: 27853 utilizando drogas antimicrobianas de uma única procedência, revelaram que as quatro drogas empregadas (carbenicilina, colistina, amicacina e gentamicina) apresentaram resultados fora dos limites de confiança.

4 - Os antibiogramas feitos com discos de papel de várias procedências mostraram uma deficiência geral quanto à lincomicina.

5 - Os antibiogramas feitos com discos de papel procedentes da firma A, afora a lincomicina, se apresentaram dentro dos limites quando submetidos aos 3 germes utilizados.

6 - Os antibiogramas feitos com discos de papel procedentes da firma B, afora a lincomicina, a tetraciclina, a oxacilina e a penicilina, se apresentaram dentro dos limites quando submetidos aos 3 germes utilizados.

7 - Os antibiogramas feitos com discos de papel provenientes da firma C, além da lincomicina, apresentam-se deficientes quanto à amicacina, para os 3 germes empregados e à ampicilina e carbenicilina para os 2 germes indicados para o teste.

8 - Os antibiogramas empregando comprimidos impregnados com antimicrobianos mostraram-se deficientes quanto ao cloranfenicol, à nitrofurantoina e à penicilina, para os germes recomendados para o teste.

9 - É indispensável a realização do controle de qualidade das provas de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos, pelos laboratórios de microbiologia clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- 1 - ANDERSON, B. - Improved susceptibility disc assay method employing an agar overlay technique. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 14(5): 761-4, 1978.
- 2 - ARVIDSON, S.; DORNBUSCH, K.; ERICSSON, H. - Interpretation of the agar diffusion method for bacterial susceptibility testing. J. Antimicrob. Chemother., London, 7(1): 5-14, 1981.
- 3 - BALLOWS, A. & GAVAN, T.L. - Quality control methods for in vitro antibiotic susceptibility testing. In: LORIAN, V. ed. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. p. 409-17.
- 4 - BARRY, A.L. et al. - Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. J. Clin. Microbiol., Washington, 10(6): 885-9, 1979.
- 5 - BARRY, A.L.; EFFINGER, L.J. - Performance of Mueller Hinton agars prepared by three manufacturers. Amer. J. clin. Path., Philadelphia, 62: 113-7, 1974.
- 6 - BARRY, A.L. & FAY, G.D. - The amount of agar in antimicrobial disk susceptibility test plates. Amer. J. clin. Path., Philadelphia, 59: 196-8, 1973.
- 7 - BARRY, A.L.; GARCIA, F.; THRUPP, L.D. - An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. Amer. J. clin. Path., Philadelphia, 53: 149-58, 1970.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos, de acordo com o WORLD MEDICAL PERIODICALS, 3. ed., New York, 1961.

- 8 - BARRY, A.L. et al. - Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations. Amer. J. clin. Path., Philadelphia, 59: 693-9, 1973.
- 9 - BARTLETT, R.C. et al. - Clinical microbiology. In: INHORN, S. L., ed. Quality assurance practices for health laboratories. Washington, American Public Health Association, 1978. p. 926-36.
- 10 - BAUER, A.W. et al. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer.J.clin. Path., Philadelphia, 45: 493-6, 1966.
- 11 - BAUER, A.W.; PERRY, D.M.; KIRBY, W.M.M. - Single disc antibiotic sensitivity testing of staphylococci. Arch. int. Med., Chicago, 104: 208-16, 1956.
- 12 - BLAZEVIC, D.J.; HALL, C.T.; WILSON, E.M. - Practical quality control procedures for the clinical microbiology laboratory. Cumitech, Washington, 3: 3-5, 1976.
- 13 - BLAZEVIC, D.J.; KOLPCKE, M.H.; MATSEN, J.M. - Quality control testing with the disc antibiotic susceptibility test of Bauer-Kirby-Sherris-Turck. Amer. J. cli. Path., Philadelphia, 57: 592-7, 1972.
- 14 - BONDI, A. et al. - A routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. Amer. J. Med. Sci., Thorofare, 213: 221-5, 1947.
- 15 - BRENNER, V.C. & SHERRIS, J.C. - Influence of different media and bloods on the results of diffusion antibiotics susceptibility tests. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 1(2): 116-22, 1972.

- 16 - BROWN, D.F. & KOTHARI, D. - Comparison of antibiotic discs from different sources. J. clin. Path., London, 28: 779-83, 1975.
- 17 - BROWN, D.F. & KOTHARI, D. - Comparison of tablets and paper discs for antibiotic sensitivity testing. J. clin. Path., London, 28: 983-8, 1975.
- 18 - COOPER, K.E. & LINTON, A.H. - The importance of temperature during early hours of incubation of agar plates in assays. J. gen. Microbiol., Elstree, 7: 8-17, 1952.
- 19 - DAVIS, D.S.; IANNETTA, A.; WEDGWOOD, J.R. - Activity of colistin against Pseudomonas aeruginosa inhibition by calcium. J. infect. Dis., Chicago, 124(6): 610-2, 1971.
- 20 - DREW, L.W. et al. - Reliability of the Kirby-Bauer disc diffusion method for detecting methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., Baltimore, 24(2): 240-7, 1972.
- 21 - ERICSSON, H. - The disc method in quantitative determination of sensitivity to antibiotics. Posgrad. med. J., London, 43: 46-9, 1967.
- 22 - ERICSSON, H. - The paper disc method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics studies on the accuracy of technic. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 12: 408-43, 1960.
- 23 - ERICSSON, H. et al. - A paper disc method for determination of bacterial sensitivity to chemotherapeutic and antibiotic agents. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 6(11): 23-36, 1954.

- 24 - ERICSSON, H. & SHERRIS, J.C. - Antibiotic sensitivity testing reports of international collaborative study. Acta path. microbiol. scand., Suppl., Kopenhage, 217: 27-44, 1971.
- 25 - ERICSSON, H.; TURNEVALL, G.; WICKMAN, R. - The paper disc method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics relationship between the diameter of the zone of inhibition and minimum inhibitory concentration. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 12: 414-22, 1960.
- 26 - ESCOBAR, G.A. - Importancia del medio de cultivo sobre el tamaño del halo de inhibición en las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Invest. Med. Intern., México, 4(suppl. 1): 3-16, 1977.
- 27 - ESSER, V.M. & ELEFSON, D.E. - Experiences with the Kirby-Bauer method of antibiotic susceptibility testing. Amer. J. clin. Path., Philadelphia, 54: 193-8, 1970.
- 28 - ESTADOS UNIDOS. National Archives and Records Service. Office of the Federal Register. Food and Drugs, 21. In: _____. Code of federal regulations. Washington, U. S. Government Printing Office, 1979. Part 460, p. 654-63.
- 29 - ESTADOS UNIDOS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. 2.ed. Villanova, 1979. NCCLS Approved Standard, ASM-2
- 30 - FABIUS, G.T.J.; GESTEL, M.V.; MOUTON, R.P. - Comparison of discs and tablets for antibiotic sensitivity testing. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 44: 459-60, 1978.

- 31 - FINE, S.D. - Fed. Reg., Washington, 37; sept. 30, 1972.
5p. [F.R. 20525].
- 32 - FOSTER, J.W. & WOODRUFF, H.B. - Microbiology aspects
of penicillin. J. Bact., Baltimore, 46: 187-202 ,
1943.
- 33 - GARROD, L.P. & WATERWORTH, P.M. - a study of antibiotic
sensitivity testing with proposals for simple uniform
methods. J.clin.Path., London, 24: 779-89, 1971.
- 34 - GARROD, L.P. & WATERWORTH, P.M. - Effect of medium com
position on the apparent sensitivity of Pseudomonas
aeruginosa to gentamicin. J. clin. Path., London,
22: 534-8, 1969.
- 35 - GAVAN, T.L. et al. - Quality control limits for Ampicil
lin, Carbenicillin, Mezlocillin, and Piperacillin
disk Diffusion Susceptibility tests:a collaborative
study. J. clin. Microbiol., Washington, 14(1):
67-72, 1981.
- 36 - GRIFFITH, L.J. & MULLINS, C.G. - Drug Resistance as in
fluenced by inactivated sensitivity discs. Appl.
Microbiol., Baltimore, 16(4): 656-8, 1968.
- 37 - HANUS, F.J.; SANDS, J.G.; BENNETT, E.O. - Antibiotic
activity in the presence of agar. Appl. Microbiol.,
Baltimore, 15(1): 31-4, 1967.
- 38 - JACQUES, F.A. - The disc susceptibility test. In: LO
RIAN, V., ed. Antibiotic in laboratory medicine .
Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. p. 24-54.
- 39 - JONES, R.N.; EDSON, D.C.; MARYMONT, J.V. - Evaluations
of antimicrobial susceptibility test proficiency by
the college of American Pathol. Survey Program. Amer.
J. clin. Path., Philadelphia, 78: 168-72, 1982.

- 40 - KLUGE, R.M. - Accuracy of Kirby-Bauer susceptibility tests read at 4 hs, 8, and 12 hours of incubation: comparison with readings at 18 to 20 hours. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 8(2): 139-45, 1975.
- 41 - KNOWLES, R.C.; MOORE, T.D. - Quality control of agar diffusion susceptibility tests. Data from the quality assurance service microbiology program of the College of American Pathologists. Amer. J. clin. Pathol., Philadelphia, 74: 581-5, 1980.
- 42 - KRAMER, J. & KIRSHBAUM, A. - Effect of paper on the performance assay in the control of antibiotic sensitivity discs. Appl. Microbiol., Baltimore, 9: 334-6, 1961.
- 43 - KUNION, C.M. & EDMONDSON, W.P. - Inhibitor of antibiotic in bacteriologic agar. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), New York, 129: 118-22, 1968.
- 44 - LAWRENCE, R.M. & HOEPRICH, P. - Totally synthetic medium for susceptibility testing. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 13(3): 394-8, 1978.
- 45 - LEVEY, S. & JENNINGS, M.D. - The use of control charts in the clinical laboratory. Amer. J. clin. Path., Philadelphia, 20: 1059-66, 1950.
- 46 - LINTON, A.H. - Influence of inoculum size on antibiotic assay by the agar diffusion technique with Klebsiella pneumoniae and streptomycin. J. Bact., Baltimore, 76: 94-103, 1958.
- 47 - MINSHEW, B.H. et al. - Emergence in a burn center of populations of bacteria resistant to gentamicin, tobramycin, and ampicillin: evidence for the need for changes in zone diameter interpretative standards.

- Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 12: 688-96, 1977.
- 48 - MORELEY, D.C. - A simple method of testing the sensitivity of wound bacteria to penicillin and sulphathiazole by the use of impregnated blotting paper discs. J. Path. Bact., Edinburgh, 57: 379-82, 1945.
- 49 - NISHIMURA, T.; YAMAGUCHI, H.; TANAKA, N. - Biochemical studies on the activity of thiophenicol. J. Antibiot. Tokyo, 19: 166-71, 1966.
- 50 - ORGANIZACION Mundial de la Salud - Unificacion de metodos para las pruebas de sensibilidad microbiana. Ginebra, 1961. 27p. [Informes Tecnicos, 210] .
- 51 - ORGANISATION Mondiale de la Santé. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique. Genève, 1977. p. 106-38. [Rapports Techniques, 610. Annexe 5] .
- 52 - OSELKA, G.W. et al. - Avaliação "in vitro" da sensibilidade bacteriana a antibióticos (antibiograma). In: _____. Antibióticos na prática médica. 2.ed. São Paulo. Gremed. 1978. p. 87-99.
- 53 - OSTRANDER, W.E. & GRIFFITH, L.J. - An evaluation of different types of paper concerning their suitability for sensitivity discs. Antibiot. Ann., New York: 813, 1958-59.
- 54 - PFEIFFER, R.R. & ENGELL, G.L.; COLEMAN, D. - Stable antibiotic sensitivity discs. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 9(5): 848-51, 1976.
- 55 - POLLOCK, H.M. et al. - Effect of different lots of Mueller-Hinton agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of Pseudomonas aeruginosa.

Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 14(3):
360-7, 1978.

- 56 - RELLER, L.B. et al. - Antibiotic susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa: selection of a control strain and criteria for Magnesium and Calcium content in media. J. infect. Dis., Chicago, 130:454-63, 1974.
- 57 - ROSEMBLATT, J.E. & SHOENKNECHT, F. D. - Effect of several components of anaerobic incubation on antibiotic susceptibility test results. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 1: 433-40, 1972.
- 58 - RYAN, K.G.; SHOENKNECHT, F.D.; KIRBY, W.M.M. - Disc sensitive testing. Hosp. Practice, New York, 5: 91-100, 1970.
- 59 - SHAHIDI, A. & ELLNER, P.D. - Effect of mixed cultures on antibiotic susceptibility testing. Appl. Microbiol., Baltimore, 18(5): 766-70, 1965.
- 60 - SHAYEGANI, M.; PARSONS, L.M.; MAUPIN, P.S. - Bacterial antibiotic susceptibility tests, evaluation of tests performed by permit clinical laboratories in New York state exclusive of New York city. N. Y. State J. Med., Lake Success, 77(3): 370-2, 1977.
- 61 - SHERRIS, J.C.; RASHAD, A.L.; LIGHTHANT, G.A. - Laboratory determination of antibiotic susceptibility to ampicillin and cephalothin. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 145: 248-67, 1967.
- 62 - STOKES, I.E. & WHITBY, J.L. - Quality control in bacteriology: preliminary trials. J. clin. Path., London, 24: 790-7, 1971.

- 63 - THORNSBERRY, C. - Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de difusion en agar. In: BALOWS, A.- Pruebas de susceptibilidad a los antibioticos; Técnicas actualizadas. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, 1976. p. 16-25.
- 64 - THORNSBERRY, C.; CARUTHERS, J.Q.; BACKER, C.N.- Effect of temperature on the in vitro susceptibility of Staphylococcus aureus to penicillinase resistant penicillins. Antimicrob. Agents Chemother., Ann Arbor, 4(3): 263-269, 1973.
- 65 - THORNSBERRY, C.; GAVAN, T.L.; GERLACH, E.H. - New developments in antimicrobial susceptibility testing. Cumitech, Washington, 6: 1-13, 1977.
- 66 - TRAUB, W.H. - Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to gentamicyn sulfate in vitro: lack of correlation between disc diffusion and broth dilution sensitivity data. Appl. Microbiol., Baltimore, 20(1): 98-102, 1970.
- 67 - VINCENT, J.G. & VINCENT, H.W. - Filter paper modification of the oxford cup penicillin determination. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 55: 162-4, 1944.
- 68 - WASHINGTON II, J.A. - Antimicrobial susceptibility tests. J. infect. Dis., Chicago, 140(2): 261-3, 1979.
- 69 - WASHINGTON II, J.A.; WARREN, E.; KARLSON, A. - Stability of barium sulfate turbidity standards. Appl. Microbiol., Baltimore, 24(6): 1013, 1972.
- 70 - WASHINGTON II, J.A. et al. - Interpretation of the disk diffusion susceptibility test for amikacin: Report of a collaborative study. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, 15(3): 400-7, 1979.

- 71 - WOOLFREY, B.F.; FOX, J.M.; QUALL, O.C. - An analysis of error rates for disc agar-diffusion testing of Pseudomonas aeruginosa versus aminoglycosides. Am. J. clin. Pathol., Philadelphia, 75: 559-64, 1981.
- 72 - WOOLFREY, B.F.; RAMADEI, W.A.; QUALL, O.C. - Petri dish concavity - A potential source of error in antibiotic assay and agar diffusion antibiotic susceptibility tests. Amer. J. clin. Pathol., Philadelphia, 71: 433-6, 1979.
- 73 - WRIGHT, W.W. - Quality control of antibiotic susceptibility discs. In: PRIER, J.E. et al., eds. Quality control in microbiology. Baltimore, University Press, 1975. p. 69-80.
- 74 - XIMENES, J. - Importância da padronização da prova de sensibilidade bacteriana. Folha médica, Rio de Janeiro, 66(3): 113-26, 1973.
- 75 - ZIMELIS, M.V.; JACKSON, G.G. - Activity of aminoglycoside antibiotics against Pseudomonas aeruginosa: specificity and site of Calcium and Magnesium antagonism. J. infect. Dis., Chicago, 127(6): 663-9, 1973.