

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO DE CEPAS DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EM TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Silvana Tadeu CASAGRANDE*
Maria de Fátima Paiva VIEIRA
Ilka Maria LANDGRAF
José Leopoldo Ferreira ANTUNES

RIALA6/763

CASAGRANDE, S.T.; VIEIRA, M.P.F.; LANDGRAF, I.M.; ANTUNES, J.L.F.; Influência da concentração do inóculo de cepas de *Haemophilus influenzae* em testes de sensibilidade a antimicrobianos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(1): 64-8, 1994.

RESUMO: *Haemophilus influenzae* isolado de líquido cefalorraquidiano foi avaliado quanto ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos no teste de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM). A sensibilidade de 98 cepas foi comparada em relação à ampicilina no teste de difusão em ágar com inóculo 10^8 UFC/mL (tubo 0.5 da escala de MacFarland) e diluído 10^{-2} o qual corresponde a uma concentração final de aproximadamente 10^6 UFC/mL. Nos testes de difusão em ágar no qual o inóculo 10^8 UFC/mL foi usado, 56 cepas foram resistentes ampicilina, ao passo que quando o inóculo 10^6 UFC/mL foi testado, 10 dessas cepas foram resistentes. No teste de concentração inibitória mínima somente 10 cepas apresentaram CIM ≥ 2 mcg/mL, resultados estes que foram compatíveis com o halo de inibição no teste de difusão em ágar, em ambas as concentrações. A correlação do inóculo 10^8 UFC/mL e 10^6 UFC/mL no teste de difusão em ágar usando ampicilina, cefalotina, cefoxitina, fosfomicina, penicilina e sulfatrim, mostrou que a diluição do inóculo é fator significativo na determinação da sensibilidade das cepas principalmente quando testadas com antimicrobianos betalactâmicos. Esta observação conduziu à padronização do inóculo 10^6 UFC/mL para *H. influenzae*, visando a obtenção de resultados reprodutíveis e confiáveis.

DESCRIPTORIOS: *Haemophilus influenzae*, meningite bacteriana, teste de sensibilidade a antimicrobianos, betalactâmicos.

INTRODUÇÃO

Haemophilus influenzae é um dos principais agentes responsáveis por meningites bacterianas em todo o mundo a acomete fundamentalmente crianças na faixa etária de 0-5 anos de idade¹³.

O diagnóstico precoce e o tratamento à base de ampicilina têm contribuído marcadamente para o controle dessa infecção. Nos últimos anos, com surgimento de cepas resistentes, tem sido necessária a

utilização de tratamentos alternativos, assim como testes de sensibilidade a antimicrobianos que conduzam a uma resposta rápida e confiável^{14,11,10}.

O método de difusão em ágar constitui-se em um dos principais instrumentos utilizados para esta finalidade e, segundo alguns autores, mostra-se eficiente apenas mediante a observação de critérios específicos^{7,8,14}. Considerando que o inóculo utilizado pode ser crítico para um teste de sensibilidade reprodutível e confiável^{1,8,12}, avaliamos a padronização do

* Biologista da Seção de Bacterologia do Instituto Adolfo Lutz

** Biologista da Seção de Bacterologia do Instituto Adolfo Lutz

*** Pesquisadora da Seção de Bacterologia do Instituto Adolfo Lutz

**** Pesquisador da Seção de Avaliação e Normas Técnicas do Instituto Adolfo Lutz

Endereço correspondência: *Avenida Dr. Arnaldo, 351.

Seção de Bacterologia - Instituto Adolfo Lutz

mesmo em cepas de *Haemophilus influenzae*, através da utilização do meio ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de cavalo, devido ao seu baixo custo, operacionalidade e ampla difusão em nosso país.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Foram estudadas, no período de 1989 a 1990, um total de 98 cepas de *Haemophilus influenzae* isoladas de líquido cefalorraquidiano na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. O crescimento e manutenção das cepas foi feito em tubos contendo ágar chocolate a 10% (sangue de cavalo e infusão de cérebro e coração (BHI)), e incubados a 37°C a uma atmosfera de 5 a 10% de CO₂. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram usadas como cepas controles.

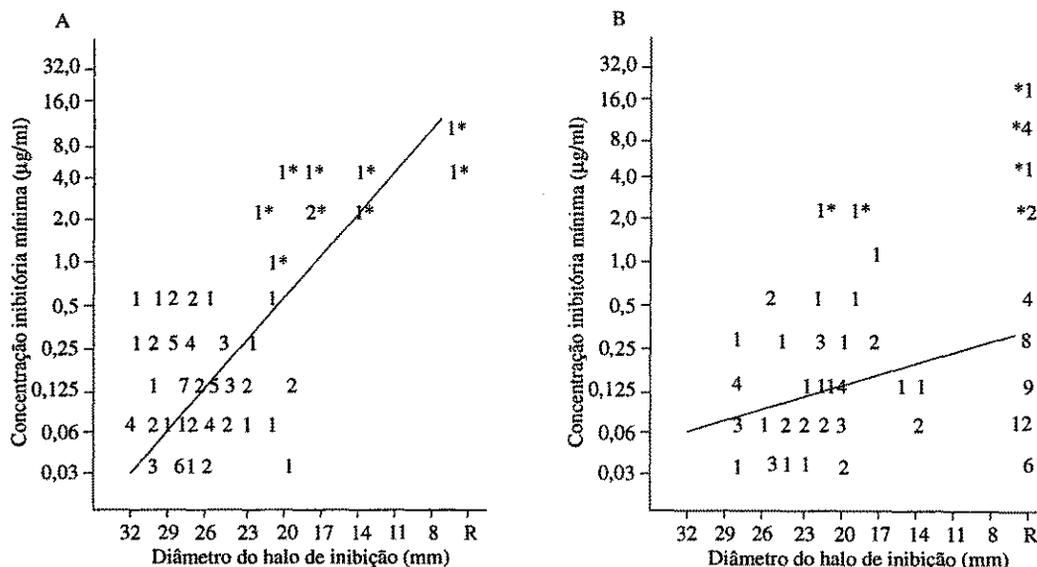
Meios de cultura. Foram utilizadas placas de ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de cavalo para os testes de difusão em ágar e "Tryptic soy broth" (T.S.B.) suplementado com 2% de fatores de crescimento, nicotinamida adenina dinucleotídeo (fator V) e hemina (fator X), para os testes de concentração inibitória mínima (CIM).

Testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos.

Teste de difusão em ágar: Foram realizados segundo BAUER et alii e Normas do "National Committee

for Clinical Laboratory Standars" (NCCLS)(1,8), empregando-se discos de ampicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, cefoxitina 30 µg, fosfomicina 30 µg, penicilina 10 U, sulfatrim (sulfametoxazol-trimetoprim) 25 µg, (marca CECON). Imediatamente após o isolamento das cepas, as mesmas foram subcultivadas em ágar chocolate BHI a 10% e incubada a 37°C a uma atmosfera de 5 a 10% de CO₂ durante 18-24h. A seguir, com o auxílio de alça bacteriológica, as cepas foram homogeneizadas em 5 ml de solução fisiológica 0.85%, ajustando-se a turbidez da suspensão de acordo com o tubo 0.5 da escala de MacFarland. Padronizado o inóculo, foram feitas diluições 10⁻², semeando-se por inundação estas diluições e também suspensões na escala 0.5 de MacFarland em placas de ágar Mueller Hinton chocolate a 5%. Após secagem por 15 minutos, os respectivos discos de antimicrobianos foram colocados à superfície do meio e as placas incubadas a 37°C. A leitura dos halos de inibição foi realizada após 18 a 24 horas de incubação.

Determinação da concentração inibitória mínima: A CIM para ampicilina foi determinada pelo método de macrodiluição, em caldo TSB, suplementado com 2% de VX. As concentrações do antimicrobiano utilizadas foram 0.06 µg/mL a 32 µg/mL⁸. A concentração final do inóculo foi de aproximadamente 10⁵ µg/mL (unidade formadora de colônia). A leitura da CIM foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano que impediu a turvação do meio de cultura observado macroscopicamente.



* cepas produtoras de β-lactamase

FIGURA 1

Correlação entre a concentração inibitória mínima (CIM) e o diâmetro do halo de inibição obtidos no teste de difusão em Ágar. (A) inóculo 1:100 (B) inóculo 10⁸ UFC/mL.

Teste de Beta Lactamase. Todas as cepas foram testadas para a verificação da presença da enzima beta-lactamase pelo método iodométrico¹⁴.

Análise Estatística. Os resultados encontrados foram submetidos a análise estatística, empregando-se os métodos do Teste de qui-quadrado e de regressão linear conforme descritos por SPIEGEL(12).

RESULTADOS

A relação entre o CIM e o diâmetro do halo de inibição para ampicilina é mostrada na Fig.1 (A) e (B).

Dentre as 98 cepas estudadas, 10 produziram a enzima beta-lactamase e apresentaram CIM $\geq 2\mu\text{g/mL}$. Destas, 3 apresentaram halo de inibição $\geq 20\text{mm}$.

A influência da concentração do inóculo no padrão de sensibilidade das cepas analisadas foi observada em função da variação do diâmetro do halo de inibição obtido. Utilizando-se inóculo diluído 1:100, 88 cepas apresentaram halo de inibição $\geq 20\text{mm}$ (Fig.1A), e enquanto que, com o inóculo 10^8UFC/mL , 56 cepas apresentaram halo de inibição $\leq 19\text{mm}$. O NCCLS⁸ recomenda diâmetro de inibição para ampicilina $\leq 19\text{mm}$ e $\geq 20\text{mm}$ para resis-

tência e sensibilidade respectivamente. A partir de 1988 o NCCLS⁹ recomenda outros valores somente quando o meio HTM (Haemophilus Test Medium) é usado para o teste de sensibilidade.

A correlação entre o inóculo 10^8 UFC/mL e 10^6 UFC/mL no teste de difusão em ágar, observada na Fig. 2, mostra que o sulfatrim foi o antimicrobiano com maior estabilidade frente a mudança do inóculo.

DISCUSSÃO

A seleção de um método para realização de teste de sensibilidade de difusão em ágar baseia-se em vários fatores, os quais incluem a precisão do método para a evidenciação da reprodutibilidade do diâmetro do halo de inibição, a fidedignidade do teste para distinguir entre microrganismos sensíveis e resistentes e deve possibilitar correlação entre o halo de inibição e a CIM avaliada pela análise de regressão linear.^{3,6,10}

Os meios de cultura normalmente utilizados tem como base o ágar Mueller-Hinton, o qual para microrganismos fastidiosos como *Haemophilus sp.*, deve ser acrescido de sangue (Mueller-Hinton chocolate 5%) ou NAD e Hemina (HTM).

Em estudos realizados para avaliação dos meios de cultura em teste de sensibilidade a antimicrobianos, para *Haemophilus sp* MENDELMAN et alii(7), demonstraram que 45% destas cepas resistentes à ampicilina, produtoras e não produtoras de beta-lactamase, não cresceram no meio HTM, e observaram também neste meio HTM, resultados contraditórios quanto à sensibilidade das cepas estudadas.

Esta constatação vem corroborar a nossa opção de escolha do ágar Mueller-Hinton chocolate a 5% para avaliação das cepas em nosso estudo.

Além da interferência do meio de cultura na realização dos testes de sensibilidade, FERNANDES et alii⁴, observaram que a padronização do inóculo constitui um fator fundamental na obtenção de halo de inibição compatível com a CIM.

Em nosso estudo, utilizando inóculo 10^6 UFC/mL , 88 cepas apresentaram-se sensíveis à ampicilina, com a CIM $\leq 1\mu\text{g/mL}$ e halo de inibição entre 20 a 32 mm. Ao analisarmos, no entanto, o perfil de sensibilidade das cepas inoculadas a uma concentração 10^8 UFC/mL , verificamos um aumento de cepas com halo de inibição $\leq 19\text{mm}$ e CIM $\leq 2\mu\text{g/mL}$, mas com ausência de produção da enzima betalactamase. Diante deste fato, alguns autores recomendam a realização do teste da betalactamase, para aumentar a margem de segurança do perfil de resistência a ser considerado^{2,3}. Dentre as cepas resistentes (fig.1A e B), 3 cepas apresentaram halo $\geq 20\text{mm}$ e seriam rela-

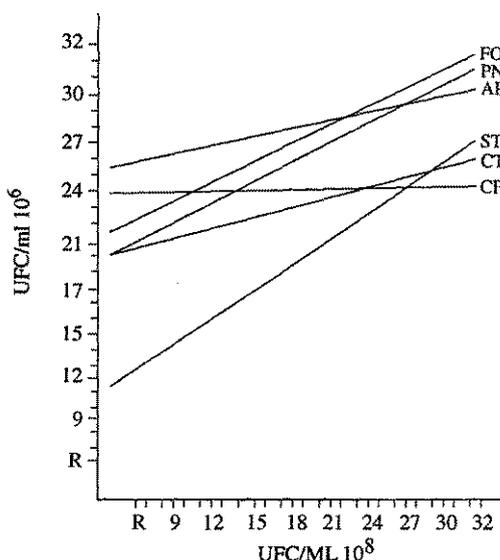


FIGURA 2

Correlação inóculo 10^8 UFC/mL e 10^6 UFC/mL no teste de difusão em ágar, através de correlação linear

AP- ampicilina 10 μg	FO- fosfomicina 50 μg
CF- cefalotina 30 μg	PN- penicilina 10U
CT- cefoxitina 30 μg	ST- sulfametometoxazol-trimetoprim 30 μg

tadas como sensíveis, porém apresentaram betalactamase, sendo portanto resistentes. Segundo DOERN et alii² a formação de halo de inibição seria devido à baixa produção de beta-lactamase por essas cepas.

A influência da concentração do inóculo no resultado da sensibilidade das cepas à ampicilina foi constatado também por ROBERTS et alii¹¹, comparando diferentes concentrações do inóculo para *Haemophilus influenzae*, o qual obteve diferentes padrões de sensibilidade em vários métodos, com resultados mais eficientes nos testes de difusão em ágar com inóculo 1:70. O mesmo efeito da concentração do inóculo pôde ser observado em cepas de *Proteus mirabilis* por FURTADO et alii⁵ que, ao utilizarem inóculo 1:100, obtiveram maior número de cepas sensíveis, as quais, no entanto, foram incluídas na categoria de intermediárias quando o inóculo compatível com o tubo 0.5 da escada de MacFarland foi utilizado.

Pela análise da Fig.2, ao compararmos as concentrações dos inóculos de *Haemophilus influenzae* no

teste de difusão em ágar para os antimicrobianos testados, observamos um maior impacto da concentração do inóculo em relação à sensibilidade a ampicilina e à cefalotina do que sulfatrim. Este fato evidencia nitidamente a influência da concentração do inóculo no teste de difusão em ágar com agentes antimicrobianos betalactâmicos.

De acordo com o observado, acreditamos ser necessária uma rigorosa observação da concentração do inóculo ao se realizar o teste de difusão em ágar, visando melhores resultados nos laboratórios clínicos, assim como uma utilização mais eficaz dos antimicrobianos na terapêutica infecciosa.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao pesquisador Moisés Palaci pelo incentivo, sugestões e colaboração na apresentação deste trabalho e a desenhista Célia Maria P.M. Yoshida pela confecção das figuras.

RIALA6/763

CASAGRANDE, S.T.; VIEIRA, M.P.F.; LANDGRAF, I.M.; ANTUNES, J.L.F.; Influence of Inoculum Concentration of *Haemophilus influenzae* strains in the antimicrobial susceptibility tests. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(1): 64-8, 1994.

SUMMARY: This study analyzes the effect of the inoculum concentration of *Haemophilus influenzae* strains to determine the antimicrobial susceptibility. A total 98 strains isolated from cerebrospinal fluid (CSF) was studied through the disk diffusion method and the minimal inhibitory concentration (MIC). The results showed that with the inoculum 10^8 UFC/mL, 56 strains were resistant to ampicillin, but with this inoculum diluted to 10^6 UFC/mL, 10 cepas of the strains were resistant to this antibiotic in the disk diffusion method. The correlation of the inoculum 10^8 UFC/ml and 10^6 UFC/ml in the disk diffusion method using disks containing ampicillin, cephalotin, cephoxitin, fosfomicin, penicillin and sulfamethoxazole/trimethoprim showed that the inoculum concentration is a significant factor in the strain susceptibility, mainly when testing betalactamic antibiotics. This observation led to a standardization of inoculum size at 10^6 UFC/mL when testing *H. influenzae*, in order to obtain dependable and reproducible results.

KEY WORDS: *Haemophilus influenzae*, bacterial meningites, antimicrobial susceptibility test, betalactamics.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. BAUER, a.W.; KIRBY, W. M. M. ; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *A. J. Clin. Path.* 45:493-496, 1966.
2. DOERN, G. V.; JORGENSEN, J. H.; THORNSBERRY, C.; PRESTON, D. A. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*: A collaborative study. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 4:95-107, 1986.
3. DOERN, G. V.; DAUM, G. S.; TUBERT, T. A. Ampicillin disk diffusion susceptibility of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 25:1675-1678, 1987.
4. FERNANDES, P.B.; HARDY, D.; BARLER, R.; McDONALD, E.; PINTAR, J.; RAMER, N.; SWANSON, R.; GADE, E. Susceptibility testing of macrolide antibiotics against *Haemophilus influenzae* and correlation of in vitro results with in vivo efficacy in a mouse septicemia model. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 31:1243-1250, 1987.

5. FURTADO, L. G.; MEDERIOS, A. A. Single-disk diffusion (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloranphenicol significance of the intermediate category. *J. Clin. Microbiol.* 12:550-563, 1980.
6. KRONVALL, G.; RINGERTZ, S.; KARLSON, I.; GORANSSON, E.; DORNBUSCH, K. Laboratory and species-specific interpretive breakpoints for disk diffusion tests of chloranphenicol susceptibility of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1484-1489, 1988.
7. MENDELMAN, P. M.; WILEY, E. A.; STULL, T. L.; CLAUSEN, C.; CHAFFIN, D. O. Problems with current recommendations for susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1480-1484, 1990.
8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2 - A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa, 1984.
9. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Tentative Standard. M2 - T4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa, 1988.
10. RINGERTZ, S.; LILYEQUEST-OLSON, B.; KROWALL, G. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* improvement of accuracy of the disk diffusion test. *J. Agents Chemoter.* 26:479-489, 1990.
11. ROBERTS, D. E.; INGOLD, A.; WANT, S. V.; MAY, J. R. Osmotically stable L forms of *Haemophilus influenzae* and their significance in testing sensitivity to penicillim. *J. Clin. Path.* 27:560-564, 1974.
12. SPIEGEL, M. R. *Estatística*. São Paulo, McGraw-Hill, 1978.
13. TAKEDA, A. K.; UMEKITA, L. F.; BOSCARDEN, N. B.; MELLES, C. E. A.; TAUNAY, A. E. Imunoelectroforese cruzada no diagnóstico da meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 34:165-169, 1979.
14. WILLIAMS, J. D.; KATTAM, S. *Haemophilus* species: Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy. London, Churchill Livingstone, 1978. p.106-111.

Recebido para publicação: 10.01.94