

## 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  $\geq 2$ 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 idade<sup>13</sup>.

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<sup>14,11,10</sup>.

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<sup>7,8,14</sup>. Considerando que o inóculo utilizado pode ser crítico para um teste de sensibilidade reprodutível e confiável<sup>1,8,12</sup>, 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 CO<sub>2</sub>. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram usadas como cepas controles.

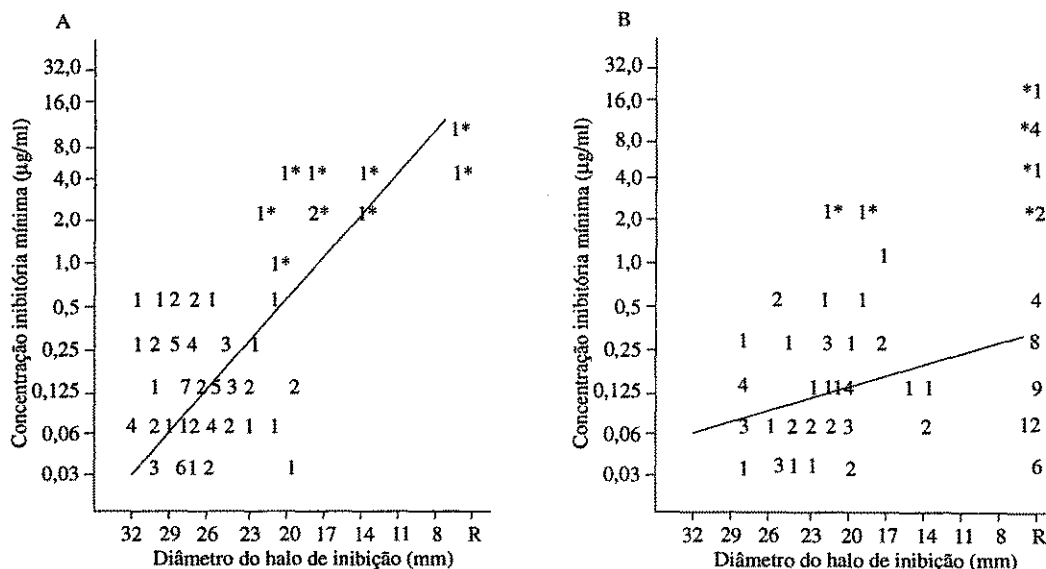
**Meios de cultura.** Foram utilizadas placas de ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de cavalo para os testes de difusão em ágar e "Tryptic soy broth" (T.S.B.) suplementado com 2% de fatores de crescimento, nicotinamida adenina dinucleotídeo (fator V) e hemina (fator X), para os testes 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 CO<sub>2</sub> 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<sup>-2</sup>, 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/mL<sup>8</sup>. A concentração final do inóculo foi de aproximadamente 10<sup>5</sup> 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 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Teste de Beta Lactamase. Todas as cepas foram testadas para a verificação da presença da enzima beta-lactamase pelo método iodométrico<sup>14</sup>.

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  $10^8\text{UFC/mL}$ , 56 cepas apresentaram halo de inibição  $\leq 19\text{mm}$ . O NCCLS<sup>8</sup> 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 NCCLS<sup>9</sup> recomenda outros valores somente quando o meio HTM (Haemophilus Test Medium) é usado para o teste de sensibilidade.

A correlação entre o inóculo  $10^8\text{ UFC/mL}$  e  $10^6\text{ UFC/mL}$  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.<sup>3,6,10</sup>

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 alii<sup>4</sup>, 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  $10^6\text{ UFC/mL}$ , 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  $10^8\text{ UFC/mL}$ , 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<sup>2,3</sup>. Dentre as cepas resistentes (fig.1A e B), 3 cepas apresentaram halo  $\geq 20\text{mm}$  e seriam rela-

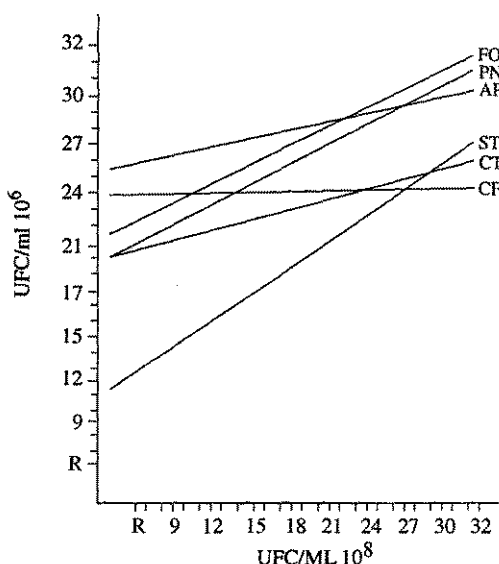


FIGURA 2

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

AP- ampicilina 10 $\mu\text{g}$	FO- fosfomicina 50 $\mu\text{g}$
CF- cefalotina 30 $\mu\text{g}$	PN- penicilina 10U
CT- cefoxitina 30 $\mu\text{g}$	ST- sulfametometoxazol-trimetoprim 30 $\mu\text{g}$

tadas como sensíveis, porém apresentaram betalactamase, sendo portanto resistentes. Segundo DOERN et alii<sup>2</sup> 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 alii<sup>11</sup>, 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 alii<sup>5</sup> 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