

***Haemophilus influenzae*: Determinación de la susceptibilidad a tres antimicrobianos mediante la aplicación de los métodos de dilución y difusión en agar**

Rico, M.^{1,2}; Mollerach, A.³; Nagel, A.³; Méndez, E.^{1,3}

1- Carrera de Especialista en Bacteriología Clínica Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo (3000) Santa Fe. Argentina

2- Laboratorio Microbiología Hospital «Gumersindo Sayago». Santa Fe

3- Sección Microbiología Laboratorio Central Hospital «José M. Cullen». Santa Fe

RESUMEN: La utilización indiscriminada de antibióticos contribuye a la resistencia bacteriana, debido a la presión selectiva que ejercen sobre estos microorganismos.

Si bien en la actualidad existen programas nacionales e internacionales de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos, que incluyen el monitoreo de rutina, de los "microorganismos fastidiosos", no todos los laboratorios de microbiología tienen acceso a los mismos.

El objetivo de este trabajo fue determinar la susceptibilidad de *Haemophilus influenzae* a ampicilina, cefotaxima y ciprofloxacina, antibióticos empleados habitualmente en nuestro medio, evaluar métodos de conservación y las técnicas propuestas por el NCCLS.

Se procesaron 17 cepas, conservadas en hisopo carbón y caldo glicerinado al 20%. Se realizaron las técnicas de dilución en medio sólido y líquido y la de difusión con discos para estos tres antimicrobianos.

Los resultados mostraron que la recuperación fue del 80% por ambos métodos y que todas las cepas fueron sensibles a los tres antimicrobianos estudiados tanto por dilución como por difusión.

Se concluye que la técnica de difusión con discos resultó fácil de implementar y accesible a un laboratorio de mediana complejidad y que los métodos de conservación fueron aceptables.

Palabras Claves: *Haemophilus influenzae*- CIM- Difusión con discos.

***Haemophilus influenzae*: determination of susceptibility to three antimicrobial agents using dilution and diffusion in agar methods.** Rico, M; Mollerach, A; Nagel, A.; Méndez, E. de los A.. The indiscriminate use of antibiotics induces bacterial resistance, due to the selective pressure they exert on microorganisms. Although there are nowadays national and international programmes which focus on vigilance of antimicrobial resistance, they do not include monitoring of "fastidious microorganisms". The aim of this work was to assess susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicillin, cefotaxime and ciprofloxacin –widely used in our area- and evaluate both preservation methods and techniques suggested by the NCCLS.

Strains (17) were processed and preserved using an activated carbon-treated cotton swab and 20% glycerin broth. Dilution (both solid and liquid media) and disk diffusion techniques were used.

The results showed an 80% recovery for both methods. All the strains were susceptible to the antimicrobials studied through both dilution and diffusion techniques

The disk diffusion technique was easy to carry out and suitable for a laboratory of average complexity. Preservation methods were also found to be acceptable.

Key words: *Haemophilus influenzae* - MIC - Disk diffusion.

Correspondencia:

Dirección postal: Marina Rico (Especialista en Bacteriología Clínica)

Gobernador Candiotti 1856. (3000) Santa Fe, Argentina

e-mail: mrico@fcb.unl.edu.ar

Introducción

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos se ha convertido en un problema global emergente.

Un componente esencial de cualquier programa de control de la resistencia lo constituye el uso apropiado de ellos. Su empleo indiscriminado en humanos, animales o en agricultura, ejerce una presión selectiva y determina la aparición de cepas resistentes. Se impone pues pensar en mejores estrategias. (1)

Para ejercer un control adecuado es necesario conocer los patrones de resistencia de las bacterias de una región o de un país y su variación en el tiempo.

Si bien en la actualidad existen programas, nacionales e internacionales de vigilancia de resistencia de las bacterias de fácil crecimiento a diversos antimicrobianos: Sistema Informático de Resistencia (SIR) de la Asociación Argentina de Microbiología -Subcomisión de Antimicrobianos y la Red de la organización mundial de la salud (Whonet) (2), etc.; ese control se realiza de rutina para las bacterias «fastidiosas» llamadas así por sus requerimientos nutricionales; pero no todos los laboratorios de Microbiología del país tienen acceso a los mismos y, por lo tanto, en algunas regiones se desconoce su espectro de resistencia.

Dentro de este grupo, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) tiene gran importancia como agente de infecciones respiratorias bajas, tanto en niños como en adultos, en otitis y en infecciones del sistema nervioso central (meningitis). (3)

Este género bacteriano, es conocido por la necesidad de factores de crecimiento X (hemina) y/o V (B-nicotinamida Adenina Dinucleótido) que se deben añadir al medio de cultivo para su crecimiento.

Durante años no fue necesario el estudio de la sensibilidad de estas bacterias por ser homogéneamente sensibles a ampicilina (AMN), siendo éste el antimicrobiano de elección, así como cloranfenicol; pero desde 1974, la aparición de cepas resistentes al primero por producción de beta-lactamasa y, desde 1976, al segundo por producción de cloranfenicol-acetil-transferasa, obligaron a determinar su sensibilidad. (4)

El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda el uso del *Haemophilus Test Medium* (HTM) en pruebas de sensibilidad para este microorganismo. Dicho medio es transparente, no es antagonista, se puede preparar comercial o artesanalmente y existe en forma de caldo o agar por lo que se sugiere tanto para estudios de difusión como para métodos de dilución. El control de calidad del medio HTM se realiza con *H. influenzae* ATCC 10211. (5). También se establecen los criterios de interpretación y los valores de los halos de inhibición y de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas de referencia de *H. influenzae* ATCC 49247 y ATCC 49766. (6).

La cuantificación de la actividad «in vitro» de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (**macrodilución**). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas popularizó el método de **dilución en agar**, en el que se permite inocular simultáneamente un gran número de cepas.

La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la aplicación del método de **microdilución** en caldo y actualmente se han generalizado los métodos comerciales, fácilmente integrables a sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados pero resultan muy costosos. (4)

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del agente, del medio de cultivo, del inóculo) que influye en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado obtenido, por lo que para su correcta

evaluación es necesario que se realicen en forma estandarizada. (6,7)

La escala de medición usada en las técnicas de dilución es discontinua, contrariamente a la del método de difusión (continua), por lo que la CIM real de una bacteria a un determinado antimicrobiano se encontrará en algún valor situado entre la CIM experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Desde el punto de vista clínico la diferencia entre ambas (real y experimental) no suele ser trascendente cuando se trata de concentraciones bajas pero, puede tener importancia para las CIM altas cercanas a las concentraciones alcanzables «in vivo».

En comparación con los métodos de difusión, los de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros, cuando se utilizan paneles comerciales de microdilución.

El objetivo de este trabajo fue a) determinar la susceptibilidad de *H. influenzae* a AMN, cefotaxima (CTX) y ciprofloxacina (CIP), antimicrobianos habitualmente empleados en nuestro medio para tratar las infecciones producidas por este microorganismo, b) evaluar la recuperación de dicha bacteria conservada por dos métodos, hisopo carbón y caldo glicerinado al 20% en freezer a -20°C y c) estimar qué prueba de sensibilidad de las propuestas por el NCCLS resulta aplicable a un laboratorio de microbiología clínica de mediana complejidad a los fines de vigilar periódicamente su resistencia.

Materiales y métodos

Se estudiaron 17 cepas de *H. influenzae* provenientes de distintos materiales clínicos (esputo, líquido cefalorraquídeo y secreción conjuntival) procesados en los laboratorios de dos hospitales de la ciudad de Santa Fe, durante un periodo de 6 meses.

La identificación se realizó por pruebas convencionales: coloración de Gram, características culturales y requerimientos nutricionales de factores V y X (satelitismo en agar sangre y Mueller-Hinton) con una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (8) Una vez identificadas las cepas fueron conservadas por duplicado en hisopo carbón y en caldo glicerinado a -20°C , hasta el momento de realizar los estudios respectivos.

El caldo glicerinado se preparó usando caldo Mueller-Hinton (MH) adicionado con 20 % de glicerol. Los hisopos carbón se prepararon de la siguiente manera: los hisopos comerciales se pretrataron hirviéndolos en una solución Sörensen pH = 7,4 (solución buffer fosfato) durante 5 minutos; se escurrieron y se sumergieron en una solución de carbón activado al 1% en agua destilada, hasta ennegrecimiento de los mismos. Luego se secaron a 37°C , se fraccionaron y se esterizaron en calor seco (170°C -1 hora).

Se siguieron las normas NCCLS tanto para la técnica de difusión como para la dilución en agar y medio líquido utilizando como medio base el HTM. (5, 6, 7, 9, 10)

En las tres técnicas se utilizaron las cepas control, *H. influenzae* ATCC 49247, ATCC 49766 y ATCC 10211.

Preparación de caldo y agar HTM

Por cada 100 ml de medio Mueller-Hinton agar o caldo, se agregó 0.2 g de extracto de levadura y 3 ml de solución stock de hematina (50 mg hematina marca Sigma N H3505, en 100ml de NaOH 0.01N). Después de autoclavar a 121°C 15 minutos y enfriar a $45-50^{\circ}\text{C}$ se le agregó 0.3 ml de una solución stock de NAD (50 mg NAD marca Sigma N 7004; en 10 ml de agua destilada esterilizadas por filtración)

El pH final del medio HTM debe estar entre 7.2-7.4. (10, 11).

Tanto el caldo como el agar HTM fueron controlados con la cepa de *H. influenzae* ATCC 10211.

Pruebas de sensibilidad

Método de difusión

Para la realización de este método se siguieron las recomendaciones del NCCLS para este microorganismo. (5)

Los discos utilizados fueron: AMN (10 μg) CTX (30 μg) y CIP (5 μg), marca Britania (6).

Métodos de dilución

Preparación de la solución de antimicrobiano

Se utilizaron sustancias valoradas de potencia conocida (μg de sustancia pura por cada mg de sustancia), que fueron conservadas siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor. La sustancia

valorada fue pesada teniendo en cuenta la pureza de las mismas en los cálculos efectuados.

Se siguió el método recomendado por NCCLS.

Teniendo en cuenta los puntos de corte de *H. influenzae* para AMN, CTX y CIP se prepararon las siguientes diluciones crecientes: (7)

AMN: 0.03 - 4.0 µg/ml (Bagó)

CTX: 0.00018 - 0.003 µg/ml (Richet)

CIP: 0.00018 - 0.06 µg/ml (Bagó)

Dilución en agar

Esta técnica se realizó siguiendo estrictamente las recomendaciones del NCCLS (7)

Interpretación de los resultados

La CIM se definió como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (no se consideró crecimiento la presencia de un halo tenue debido al propio inóculo).

Dilución en caldo

Método de microdilución

Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se prepararon en forma artesanal en el laboratorio.

Se colocó en cada uno de los pocillos 50 µl de caldo HTM. En el primer pocillo se colocó 50 µl de la mayor concentración de antimicrobiano que se fue diluyendo a la mitad por sucesivos pasajes de 50 µl a los pocillos siguientes. Posteriormente se añadió un volumen de 50 µl de inóculo diluido 1/100 a cada uno de los pocillos. Los dos últimos pocillos se utilizaron como "control positivo" y "control negativo". El volumen final de cada uno de ellos fue de 0.1 ml.

Lectura de los resultados

La CIM se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibió completamente el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilitó tomando como referencia el crecimiento observado en el pocillo usado como control positivo.

Los controles positivos presentaron una franca turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro.

Para facilitar la lectura de las placas de microtitulación se utilizó un lector con espejo en el que se reflejó la parte inferior de la misma.

Las cepas de referencia usadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25923 y *H. influenzae* ATCC 49247.

Con posterioridad a la realización de las técnicas de dilución en medio sólido y líquido se realizó el recuento de inóculo para verificar que la concentración del inóculo de trabajo del cual se partió fuera de 1×10^8 UFC/ml.

Resultados

Los datos del método de difusión con discos se muestran en la tabla 1. Todas las cepas fueron sensibles a los antimicrobianos ensayados.

En cuanto a los resultados obtenidos aplicando los métodos de dilución se detallan en la tabla 2.

Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a AMN, con valores de CIM90 iguales a 1 µg/ml para los métodos de microdilución y medio sólido. Todos los aislamientos fueron uniformemente sensibles a CIP con CIM 90 de 0.015 µg/ml. En cuanto a CTX las mismas fueron sensibles con valores de CIM 90 de 0.12 y 0.25 µg/ml con microdilución y medio sólido respectivamente.

Las cepas se conservaron durante un período de 9 meses, recuperándose el 80% de ellas, por los dos métodos utilizados.

Discusión y conclusión

Hasta el momento y teniendo en cuenta el bajo número de cepas estudiadas, no se encontró resistencia a los antibióticos ensayados. Estos resultados son coincidentes con el informe anual de la Red "Whonet" de Argentina para CTX y CIP donde sobre un total de 293 cepas en el 2000 y 278 en 2001 no se informaron resistencias a estos antibióticos.

En cambio, con respecto a AMN, los hallazgos de este trabajo no coincidieron con la mayoría de los reportes. En nuestro país se encontraron 13 cepas resistentes en el 2000 y 18 en el 2001. (2)

En América Latina los valores reportados fluctúan entre un 11% en Brasil a 24,5% en México (12), mientras que en los Estados Unidos las cepas resistentes a AMN alcanzan un 17%. (13)

En Europa estos porcentajes varían según los países entre un 8.1% en Alemania; 34.8% en Francia y 16% en Italia. (14, 15)

En Asia ocurre algo similar, los reportes de Japón oscilan entre un 11% (16), 18% (17) a 26% (18) según diferentes ciudades y centros.

En África comunican alrededor de 7% en Sudáfrica (19) y 9% en Kenia (20).

En lo concerniente a la conservación de las cepas, según el CDC el método aconsejado para *H. influenzae* es freezer a -70°C , siendo el de -20°C poco recomendado pues permite el mantenimiento de las mismas durante algunos meses (21); este hecho fue observado en el presente trabajo ya que se perdieron el 20% de las cepas almacenadas.

De los métodos de dilución usados, la CIM para AMN y CIP coincidieron en caldo y en ágar, observándose la diferencia de una dilución para CTX, que es lo aceptado por el método.

La técnica de dilución en agar permite que se procesen varias cepas simultáneamente por lo que se requiere de la conservación de las mismas en las mejores condiciones (freezer a -70°C), no disponible en la mayoría de los laboratorios nacionales.

En cuanto a las técnicas utilizadas, según Manoharan y col (22) en un estudio comparativo entre los métodos de dilución en agar, E-test y difusión con discos encontraron que este último, si bien

es sencillo de realizar mostró error "menor" para AMN (13%) y cloranfenicol (24%) cuando se lo comparó con el método de dilución en ágar; de allí que recomiendan se lo use como método preliminar o de "screening". En el presente trabajo los resultados obtenidos por las dos técnicas, dilución y difusión en ágar con discos, no concordaron con Manoharan y col. ya que las cepas ensayadas fueron sensibles por ambos métodos. Sin embargo se debe contemplar que el presente trabajo incluyó un bajo número de aislamientos.

A pesar del bajo número de aislamientos estudiados, todos resultaron sensibles por los métodos de dilución y difusión con discos mostrando este último halos de inhibición muy superiores a los correspondientes puntos de corte establecidos por el NCCLS para esta técnica.

Cabe destacar que cuando los diámetros de inhibición resulten muy cercanos a los puntos de corte antes mencionados, se deberá utilizar un método de dilución.

De la experiencia obtenida se concluye que la técnica de difusión con discos resulta fácil de implementar, para los aislamientos clínicos ocasionales y accesible a todos los laboratorios de microbiología clínica de mediana complejidad.

Tabla Nº 1: Halos de inhibición de *Haemophilus influenzae* obtenidos frente a distintos antibióticos. Método por difusión con discos según NCCLS

Antimicrobiano	N ⁽¹⁾	Límites del Rango ⁽²⁾ (mm)	NCCLS Tabla 2E M2 ⁽³⁾ (mm)
Ampicilina	17	31-34	≥ 22
Cefotaxima	17	31-54	≥ 26
Ciprofloxacina	17	29-47	≥ 21

1- N: número de cepas;

2- diámetro interior y superior de los halos de inhibición obtenidos;

3- puntos de corte de normas NCCLS para cepas sensibles.

Tabla Nº 2: Concentración Inhibitoria Mínima 90 de los tres antibióticos estudiados frente a *Haemophilus influenzae*. Métodos por dilución en medio líquido (micro) y en agar, según NCCLS.

ANTIBIÓTICOS	Métodos por dilución	N ⁽¹⁾	Límites del rango (µg/ml) ⁽²⁾	CIM 90 (µg/ml) ⁽³⁾	NCCLS TABLA 2E M7 (µg/ml) ⁽⁴⁾
AMPICILINA	MICRO	17	0.5-1	1	≤ 1
	EN AGAR	17	0.25-1	1	≤ 1
CEFOTAXIMA	MICRO	17	0.03-0.12	0.12	≤ 2
	EN AGAR	17	0.06-0.25	0.25	≤ 2
CIPROFLOXACINA	MICRO	17	0.0075-0.015	0.015	≤ 1
	EN AGAR	17	0.0075-0.03	0.015	≤ 1

1- N. Número de cepas estudiadas.

2- valores inferior y superior de las CIM obtenidas.

3- CIM 90. Concentración del antibiótico que inhibe el 90% de las cepas estudiadas.

4- Punto de corte de las normas NCCLS para las cepas sensibles.

Bibliografía

1. Alina Llops, MD y Col. 1999. Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba. Rev. Panam. de Infectología Supl.1: 33-40

2. Informe anual de países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos red Whonet Argentina 2001. Acceso por Internet: <http://www.paho.org>.

3. Yoshiro, M.; Miyoshi K.; Junichi M.; Shingo M.; Shinzaburo M.; Watanabe Y., 2004. In vitro activities of Piperacillin against b- lactamase- negative Ampicillin- resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents and Chemotherapy . 48, 4 :1229-1234

4. Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Acceso por Internet: <http://www.Seimc.org>.

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard. 2003. Eight edition M2-A8. 23.1.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing .2003. Thirteenth informational supplement M100 S13. 23, 1.

7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;

Thirteenth Informational Supplement M100 S13. 2003 23, 2.

8. Mac Faddin. 2000. "Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica". Editorial Panamericana.

9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacterial that grow aerobically; Approved Standard. 2003. Sixth Edition Document M7 A6 2003 23, 2.

10. XVII Curso intensivo de Actualización en Antimicrobianos «Dra Alicia Rossi» XII Curso Latinoamericana de Actualización en Antimicrobianos. 2003. Servicio Antimicrobianos INEI (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán.

11. Jorgensen JH, Redding JS; Maher LA; Howell AW. 1987. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* J.Clin Microbiol. 25, 11: 2105-2113

12. Mendes, C.; Marin, ME.; Quinones, F.; Sifuentes-Osornio, J.; Siller, CC.; Castanheira, M.; Zoccoli, CM.; Lopez, H.; Sucari, A.; Rossi, F.; Angulo, GB.; Segura, AJ.; Starling, C.; Mimica, I.; Felmingham, D. 2003. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). Braz J. Infect. Dis. 71:44-61.

13. Jacobs, M.R.; Felmingham, D.; Appelbaum, P.C.; Gruneberg, R.N. 2003. The Alexander Project Group. 1998-2000:

susceptibility of pathogens isolates from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **5**, 2: 229-246.

14. Blosser-Middleton, R.; Sahn, D.F.; Thornsberry, C.; Jones, M.E.; Hogan, P.A.; Critchley, I.A.; Karlowsky, J.A. Antimicrobial susceptibility of 840 clinical isolates of *Haemophilus influenzae* collected in four European countries in 2000-2001. 2003. *Clin. Microbiol. Infect.* **9** 5: 431-436

15. Nicoletti, G.; Blandino, G.; Caccamo, F.; Friscia, O.; Schito, A.M.; Speciale, A.; The Italian Epidemiological Survey 1997-1999. 2002. Antimicrobial susceptibility data of *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Italy. *J. Antimicrob. Agents.* **20**, 4: 263-269

16. Yamazaki, Y.; Yagi, H.; Kubo, K.; Morita, M.; Hirayama, J.; Hayasaka, M.; Harada, K.; Honda, T.; Hirai, K.; Yanagisawa, H. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated in major hospitals in Nagano Prefecture. *J. Antibiot.* **55**, 5: 524-536.

17. Tanimoto, A.; Sadahisa, K.; Hayashibara, T.; Yamane, Y.; Adachi, Y.; Karino, K.; Yamauchi, Y.; Umeki, F.; Yasunaga, M.; Moriki, S. 2002. Beta-lactamase activity and susceptibilities to antibiotics among some species of bacteria isolated from medical institution between December 1999 and February 2000. *J. Antibiot.* **55**, Suppl A: 79-85.

18. Hasegawa, K.; Yamamoto, K.; Chiba, N.; Kobayashi, R.; Nagai, K.; Jacobs, MR.; Appelbaum, PC.; Sunakawa, K.; Ubukata, K. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb. Drug. Resist.* **9** 1:39.

19. Liebowitz, LD.; Slabbert, M.; Huisamen, A. 2003. National Surveillance Programme on susceptibility patterns of respiratory pathogens in South Africa: moxifloxacin compared with eight other antimicrobial agents. *J. Clin. Pathol.* **56**, 5: 344-347.

20. Kariuki, S.; Muyodi, J.; Mirza, B.; Mwatu, W.; Daniels, JJ. 2003. Antimicrobial susceptibility in community-acquired bacterial pneumonia in adults. *Med. J.* **80**, 4: 213-217.

21. Manual for the National Surveillance of Antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae*: Epidemiological and Microbiological Methods 1994. CDC Atlanta **17**:94-95

22. Manoharan, A.; Pai, R.; Shankar, V.; Thomas, K.; Lalitha, MK. Comparison of diffusion & E test methods with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. 2003. *Indian J Med Res*; **117**:81-87.