

ESTUDO COMPARATIVO DA SENSIBILIDADE DA *NEISSERIA MENINGITIDIS*, SOROGRUPOS "A" E "C", À SULFADIAZINA, MEDIANTE EMPREGO DE DISCOS E DE CONCENTRAÇÕES VARIADAS DE SULFADIAZINA EM MEIO SÓLIDO *

Ilka Maria Landgraf LEE **
Mathilde RASKIN **
Maria Regina N. Ramires ESPER **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Elena Emiko SAKATA **
Augusto E. TAUNAY **
Gil Vital Alvares PESSÓA **

RIALA6/450

LEE, I.M.L.; RASKIN, M.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E.; TAUNAY, A.E. & PESSÓA, G.V.A. — Estudo comparativo da sensibilidade da *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C, à sulfadiazina, mediante emprego de discos e de concentrações variadas de sulfadiazina em meio sólido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):17-21, 1978.

RESUMO: No boletim n.º 588 da OMS, série de Comunicações Técnicas sobre "A luta contra a meningite cérebro-espinhal", 1976, é aconselhada a pesquisa contínua da sensibilidade da *Neisseria meningitidis* aos sulfamídicos e recomendada também a exposição da cepa a concentrações crescentes de sulfadiazina incorporada ao meio ágar-Mueller-Hinton, nas quantidades de 0,1; 1,0; 5,0 e 10 mg%. Neste trabalho foi empregada a técnica descrita por H. A. Feldman (1967), que utiliza as concentrações especificadas pela OMS. Foram testadas 200 cepas de *Neisseria meningitidis*, sendo 100 do sorogrupo A e 100 do sorogrupo C, sendo verificada, simultaneamente, a sensibilidade das cepas à sulfadiazina em discos procedentes dos Laboratórios Difco, U.S.A., impregnados com 0,3 mg% do quimioterápico, segundo o método de Bauer, Kirby *et alii*.

DESCRIPTORIOS: *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A, C; *Neisseria meningitidis*, sensibilidade à sulfadiazina; sulfadiazina, sensibilidade da *Neisseria meningitidis*.

INTRODUÇÃO

O impacto do trabalho pioneiro de Ehrlich na quimioterapia, iniciado em 1905, com a sintetização dos compostos arsenicais 606 e 914, Salvarsan e Neosalvarsan respectivamente, de ação sobre os tripanossomas e treponemas,

levou à procura de novos compostos. Dentre esses destacavam-se os azo-compostos e um deles, a sulfamidocrisoidina, sintetizada em 1932 por Mietzsch e Klarer, despertou o interesse de Domagk. Em suas experiências, ele observou que a sulfamidocrisoidina patenteada sob o nome do Prontosil rubrum prote-

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Apresentado ao 8.º Congresso Brasileiro de Microbiologia, realizado no Rio de Janeiro, RJ, de 24 a 28 de julho de 1977.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

LEE, I.M.L.; RASKIN, M.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E.; TAUNAY, A.E. & PESSOA, G.V.A. — Estudo comparativo da sensibilidade da *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C, à sulfadiazina, mediante emprego de discos e de concentrações variadas de sulfadiazina em meio sólido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):17-21, 1978.

gia camundongos infectados por *Streptococcus*, porém perdia sua propriedade bactericida *in vitro*.

Esta diferença foi explicada por TRÉFOUEL *et alii* no Instituto Pasteur, na França, quando mostraram que, no organismo, a sulfamidocrisoidina era desdobrada, libertando um composto mais simples, o agente ativo ao qual se devia o efeito quimioterápico, a p-aminobenzenosulfonamida ou, simplesmente, sulfanilamida⁴. Experimentalmente, este quimioterápico, ativo tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrou-se eficaz não somente no combate ao *Streptococcus*, como também, a outros microrganismos, dentre os quais a *N. meningitidis*.

Vários derivados da sulfanilamida foram sintetizados, com a finalidade de obtenção de preparados menos tóxicos e com ação antibacteriana mais extensa, situando-se dentre eles a sulfadiazina.

Em um curto período de tempo, de 1941 a 1942, foi observado por DINGLE *et alii*⁵ e por FELDMAN *et alii*⁷ que a sulfadiazina era uma droga eficaz no tratamento, tanto da meningite meningocócica, como também na eliminação de *N. meningitidis* do nasofaringe de portadores. Esta última observação foi confirmada por KUHNS *et alii*¹⁰ em estudos profiláticos conduzidos entre 15.000 soldados, e por CHEEVER *et alii*⁸, em pesquisa realizada em um centro naval, ambos em 1943.

Nesses trabalhos foi verificado que o controle de surtos meningocócicos poderia ser obtido através do tratamento, em massa, de portadores, com doses relativamente pequenas de sulfadiazina, o que levou a um estado de despreocupação geral frente a esse problema⁷.

Contudo, em 1948, SCHOENBACH & PHAIR¹³ salientaram, em um estudo cuidadoso, que a situação se modificava já em 1944 e 1945, quando doses maiores e repetidas de sulfadiazina se tornaram necessárias, em vista de um aumento da resistência da *N. meningitidis* a esta sulfa.

Desde então, muitos pesquisadores realizaram trabalhos que procuravam verificar a resistência ou sensibilidade da *N. meningitidis* às sulfas, empregando, porém, técnicas distintas, não só quanto às concentrações do quimioterápico, como também quanto ao inóculo e ao critério de avaliação dos resultados obtidos^{6, 9, 11, 12}. Observa FELDMAN⁶ que em muitos desses trabalhos não foi verificado o sorotipo das cepas testadas, por não ter sido valorizada a relação entre os sorogrupos das *N. meningitidis* e sua sensibilidade aos sulfamídicos.

No boletim n.º 588 da Organização Mundial da Saúde, série de Comunicações Técnicas

sobre "A luta contra a meningite cérebro-espinal", 1976¹², um grupo de estudo expressa a necessidade de se manter a continuidade destas pesquisas, lembrando que os sulfamídicos se constituem em um medicamento de fácil administração e de custo relativamente baixo.

Visando uma avaliação atual do grau de sensibilidade da *N. meningitidis* aos sulfamídicos, foi desenvolvido um trabalho testando a sensibilidade *in vitro* destas bactérias à sulfadiazina, mediante o emprego de duas técnicas: a da difusão do quimioterápico em discos e a que verifica a ação de concentrações variadas do quimioterápico incorporado ao meio sólido em placa de Petri.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 200 cepas de *N. meningitidis*, sendo 100 do sorogrupo A e 100 do sorogrupo C, todas provenientes de líquor cefalorraquidiano de pacientes internados com meningite purulenta, no Hospital Emílio Ribas.

Para o método do disco foi adotada a técnica de Bauer, Kirby *et alii*¹.

Para o método da diluição em placa, foi seguida a técnica de FELDMAN⁶, que é a mesma recomendada pelos autores no Boletim n.º 588 da OMS¹², segundo a qual são empregadas 4 placas com as concentrações de 0,1; 1,0; 5,0 e 10 mg% do farmaco, além de 1 placa controle, sem sulfadiazina.

Culturas de *N. meningitidis* em ágar-sangue-Mueller-Hinton (MH), de 24 horas, foram repicadas para 5 ml de caldo Mueller Hinton (MH), de modo a se obter uma turvação padrão, de acordo com a técnica de Bauer, Kirby *et alii*¹ e incubadas em ambiente de 5-10% de CO₂, em câmara úmida, a 36°C, durante 18 horas. Destas culturas foram feitas diluições a 1:10, transferindo-se 0,5 ml das mesmas para 4,5 ml de caldo MH, sendo então levadas ao banho-maria durante 4 horas. Decorrido esse tempo, as placas com ágar MH contendo as concentrações variadas de sulfadiazina e a placa controle foram semeadas, empregando-se uma alça de platina padronizada para transferir 0,05 ml do inóculo. Cada placa foi dividida em 10 setores, sendo dois destinados para a mesma cepa, semeada através de estrias no sentido radial.

Com o mesmo material diluído, foi semeada uma placa de ágar MH, inundando-se a superfície do meio e retirando-se o excesso com pipeta Pasteur. Após deixar secar a placa

LEE, I.M.L.; RASKIN, M.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E.; TAUNAY, A.E. & PESSOA, G.V.A. — Estudo comparativo da sensibilidade da *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C, à sulfadiazina, mediante emprego de discos e de concentrações variadas de sulfadiazina em meio sólido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):17-21, 1978.

a 36°C durante 15 minutos, foi colocado um disco de sulfadiazina, de procedência Difco.

Todas as placas semeadas foram incubadas em ambiente de 5 a 10% de CO₂, em câmara úmida, a 36°C, durante 24 horas.

No método do disco, foi considerada sensível a cepa que apresentava um halo de inibição do crescimento com um diâmetro igual ou superior a 17 mm.

No método de diluição em placa, considerou-se a concentração de 1,0 mg% como

significativa para efeito de comparação com os resultados obtidos através do emprego do disco, nos quais a concentração de sulfadiazina é de 0,3 mg%.

RESULTADOS

Os resultados obtidos em relação à sensibilidade de *Neisseria meningitidis* A e C à sulfadiazina encontram-se expressos nas tabelas 1, 2 e 3.

TABELA 1

Estudo comparativo da sensibilidade de 100 cepas de Neisseria meningitidis, sorogrupo A e 100 cepas de Neisseria meningitidis, sorogrupo C à sulfadiazina em relação ao método da diluição em placa e ao método do disco

| <i>N. meningitidis</i> | Método da diluição em placa | | | | Método do disco |
|------------------------|-----------------------------|-----|-----|------|------------------|
| | Sulfadiazina mg% | | | | Sulfadiazina mg% |
| | 0,1 | 1,0 | 5,0 | 10,0 | 0,3 |
| Sorogrupo A | | | | | |
| cepas sensíveis | 2 | 42 | 99 | 99 | 52 |
| Sorogrupo C | | | | | |
| cepas sensíveis | 5 | 14 | 88 | 17 | 17 |

TABELA 2

Percentual de concordância dos resultados obtidos no estudo da sensibilidade dos sorotipos A e C de Neisseria meningitidis em relação ao método da diluição em placa e ao método do disco

| <i>N. meningitidis</i> | Método da diluição em placa | Método do disco | Percentual de concordância dos 2 métodos |
|------------------------|-----------------------------|------------------------|--|
| | sulfadiazina a 1,0 mg% | Sulfadiazina a 0,3 mg% | |
| Sorogrupo A | | | |
| cepas sensíveis | 42 | 52 | 80 |
| cepas resistentes | 58 | 48 | |
| Sorogrupo C | | | |
| cepas sensíveis | 14 | 17 | 82 |
| cepas resistentes | 86 | 83 | |

LEE, I.M.L.; RASKIN, M.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E.; TAUNAY, A.E. & PESSOA, G.V.A. — Estudo comparativo da sensibilidade da *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C, à sulfadiazina, mediante emprego de discos e de concentrações variadas de sulfadiazina em meio sólido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33(1):17-21, 1978.

TABELA 3

Variação do perfil de resistência de *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C à sulfadiazina ocorrida nos anos de 1974 e 1976, analisada pelo método da diluição em placa, utilizando 1,0 mg% de sulfadiazina, e pelo método do disco

| <i>N. meningitidis</i> | Método da diluição em placa | | Método do disco | |
|------------------------|-----------------------------|----------|------------------------|----------|
| | Sulfadiazina a 1,0 mg% | | Sulfadiazina a 0,3 mg% | |
| | 1974 | 1976 | 1974 | 1976 |
| Sorogrupo A | | | | |
| cepas testadas | 29 | 71 | 29 | 71 |
| cepas resistentes | 16 (55%) | 42 (60%) | 7 (25%) | 41 (58%) |
| Sorogrupo C | | | | |
| cepas testadas | 51 | 49 | 51 | 49 |
| cepas resistentes | 48 (94%) | 38 (77%) | 48 (94%) | 35 (71%) |

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O grupo de estudo da OMS, cujo trabalho foi publicado no boletim n.º 588 (OMS), assinala que, sob o ponto de vista clínico e epidemiológico, não convém negligenciar a pesquisa da sensibilidade aos sulfamídicos, no estudo bacteriológico da *Neisseria meningitidis*. Por outro lado, recomenda o método da diluição em placa, empregando meio de ágar-Mueller-Hinton e a sulfadiazina nas concentrações de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 mg%.

FELDMAN⁶ adotando essas mesmas concentrações, já observara, durante o ano de 1965 e até setembro de 1966, 50% de resistência a 1,0 mg% de sulfadiazina.

Também HOLLIS *et alii*⁵, desenvolvendo um estudo para a caracterização da *Neisseria lactamica*, verificaram a sensibilidade de 74 cepas à sulfadiazina, mediante o método da diluição em placa e tomando como referência a concentração de 1,0 mg%.

Foi testada a sensibilidade à sulfadiazina de 200 cepas de *N. meningitidis* dos sorogrupos A e C, isoladas de líquido de pacientes com meningite purulenta, empregando-se o método

do disco, segundo BAUER *et alii*¹, e o método da diluição em placa, nas concentrações estipuladas pela OMS e adotadas por FELDMAN.

Observando-se a tabela 1, notamos que os resultados foram equivalentes nas concentrações da sulfadiazina em placa, a 1,0 mg%, e em disco, com 0,3 mg%, alcançando a concordância de 80% para as cepas do sorogrupo A e 82% para as do sorogrupo C, o que, em média, significou concordância ao nível de 81% entre os dois métodos (tabela 2).

Observou-se uma variação do perfil de resistência das cepas em estudo, em dois períodos distintos, ou seja, em 1974 quando ainda ocorria a epidemia por *Neisseria meningitidis* na cidade de São Paulo e, em 1976, quando já eram limitados os casos de meningite meningocócica. A análise desta variação através dos métodos empregados revelou um aumento da resistência das cepas do sorogrupo A e uma diminuição no que se refere às cepas do sorogrupo C (tabela 3).

Parece-nos que a concordância elevada entre os dois métodos justificaria o emprego de discos impregnados com 0,3 mg% de sulfadiazina como padrão na rotina de verificação de sensibilidade de *N. meningitidis*.

LEE, I.M.L.; RASKIN, M.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E.; TAUNAY, A.E. & PESSOA, G.V.A. — Estudo comparativo da sensibilidade da *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C, à sulfadiazina, mediante emprego de discos e de concentrações variadas de sulfadiazina em meio sólido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):17-21, 1978.

RIALA6/450

LEE, I.M.L.; RASKIN, M.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E. E.; TAUNAY, A.E. & PESSOA, G.V.A. — Comparative sensitivity to sulfadiazine of *Neisseria meningitidis*, serogroups A and C, as tested by using discs and variable concentrations of sulfadiazine in solid medium. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):17-21, 1978.

SUMMARY: In the OMS technical communications "The fight against the cerebrospinal meningitis", 1976, it is recommended to continue the search for meningococcal sensitivity to sulfadiazine through the plate dilution technique using Mueller-Hinton agar and the sulfadiazine at concentrations of 0.1, 1.0, 5.0, and 10.0 mg%. In the present study, the technique used by H.A. Feldman (1967) was used with the same concentrations suggested by the OMS. 200 strains of *Neisseria meningitidis* (100 belonging to serogroup A and 100 to serogroup C) were tested including their sensitivity to sulfadiazine in discs, using Difco discs with 0.3 mg% and the Bauer, Kirby *et alii's* method. There was 81% of agreement between the two methods, when the concentration of 1.0 mg% was employed.

DESCRIPTORS: *Neisseria meningitidis*, serogroups A, C; *Neisseria meningitidis*, susceptibility to sulfadiazine; sulfadiazine, susceptibility of *Neisseria meningitidis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. clin. Path.*, 45: 493-6, 1966.
2. CHEEVER, F.S.; BREESE, B.B. & UPHAM, H.C. — The treatment of meningococcus carriers with sulfadiazine. *Ann. intern. Med.*, 19: 602-8, 1943.
3. DINGLE, J.H.; THOMAS, L. & MORTON, A.R. — Treatment of meningococcal meningitis and meningococemia with sulfadiazine. *J. am. med. Ass.*, 116: 2666-8, 1941.
4. DRIGALSKI, W. — *L'homme contre les microbes*. 6^{ème} ed. Paris, Plon, 1955.
5. EICKHOFF, T.C. & FINLAND, M. — Changing susceptibility of meningococci to antimicrobial agents, *New Engl. J. Med.*, 272: 395-8, 1965.
6. FELDMAN, H.A. — Sulfonamide-resistant meningococci. *Ann. Rev. Med.*, 18: 495-506, 1967.
7. FELDMAN, H.A.; SWEET, L.K. & DOULING, H.F. apud FELDMAN, H.A. 7.
8. HOLLIS, D.G.; WIGGINS, L. & WEAVER, R.E. — *Neisseria lactamica* sp. n., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. *Appl. Microbiol.*, 17: 71-7, 1969.
9. IVLER, D.; LEEDON, J.M.; THRUPE, L.D.; WEHRLE, P.F.; PORTNOY, B. & MATHIES, JR., A.W. — Naturally occurring sulfadiazine-resistant meningococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4: 444-50, 1964.
10. KUHN, D.M.; NELSON, C.T.; FELDMAN, H.A. & KUHN, L.R. — The prophylactic value of sulfadiazine in the control of meningococcal meningitis. *J. am. med. Ass.*, 123: 335-9, 1943.
11. LOVE, JR., B.D. & FINLAND, M. — In vitro susceptibility of meningococci to eleven antibiotics and sulfadiazine. *Am. J. med. Sci.*, 228: 534-9, 1954.
12. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Lutte contre la méningite cerebro-spinale. Genève, 1976. Sér. Rapp. techn. 588.
13. SCHOENBACH, E.B. & PHAIR, J.J. — The sensitivity of meningococci to sulfadiazine. *Am. J. Hyg.*, 47: 177-86, 1948.

Recebido para publicação em 14 de setembro de 1977.

