

INSTITUTO DE HYGIENE DE SÃO PAULO

Caixa Postal, 1985 — São Paulo — Brasil

BOLETIM N.º 44

DIRECTOR: DR. G. H. DE PAULA SOUZA

Estudo epidemiologico e bacteriologico da meningite cerebro-espinhal epidemica na cidade de São Paulo — Brasil

PELO

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

Assistente do Instituto de Hygiene de São Paulo

Separata da "Revista de Biologia
e Hygiene - Vol. II — Fasc. I - 1929

1930

Escolas Profissionais do Lyceu Coração de Jesus
— São Paulo —

ESTUDO EPIDEMIOLOGICO E BACTERIOLOGICO DA MENINGITE CEREBRO-ESPINHAL EPIDEMICA NA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL. (1)

pelo

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

Assistente do Instituto de Hygiene de S. Paulo

I

ESTUDO EPIDEMIOLOGICO

1 — Morbilidade e Mortalidade

A meningite cerebro espinhal epidemica installou-se na cidade de São Paulo apresentando no começo casos esporadicos muito espassados, mantendo-se em seguida sob a forma endemica.

Um obito, o primeiro, foi registado pelo Annuario Demographic em 1914. Quatro annos após, em 1918, dois obitos, em 1919, tres, sendo que, dahi por diante é rarissimo o mez em que se não registre no minimo um caso.

Damos a seguir dois quadros, um sobre a morbilidade e outro sobre a mortalidade da meningite cerebro espinhal epidemica na cidade de São Paulo.

(1) — Trabalho apresentado á “IV Conferencia Pan-Americana de Hygiene, Microbiologia e Pathologia”, reunida no Rio de Janeiro, em Julho de 1929.

Morbilidade

Casos de Meningite Cerebro Espinhal Epidemica — S. Paulo

	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	T	coeff. morb. 100,000 hab.
1921	2	2	5	7	8	4	8	8	5	5	6	3	33	10,6
1922	4	2	1	2	3	9	14	14	10	7	22	9	97	15,2
1923	4	1	7	6	12	15	6	13	7	10	6	5	92	12,4
1924	2	4	7	5	10	9	2	3	4	2	12	5	65	8,2
1925	1	3	8	4	7	2	8	4	5	4	6	4	56	6,8
1926	1	2	2	6	6	1	6	5	3	4	1	1	38	4,4
1927	2	0	3	3	2	3	4	3	2	2	4	2	30	3,1
1928	0	0	4	6	7	4	2	0	5	4	3	2	37	3,6

Mortalidade

Mortes pela Meningite Cerebro Espinhal Epidemica — S. Paulo

	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	T	Coeff. 100.000	Percent. fatalidade
1920	0	3	5	0	3	1	2	3	2	3	1	2	25	4,28	—
1921	0	2	1	1	5	1	3	2	0	1	1	2	20	3,54	31,7
1922	1	1	1	1	1	1	8	2	3	1	7	2	29	4,54	29,8
1923	2	2	2	1	4	6	4	7	0	1	3	1	33	4,45	35,8
1924	0	1	2	5	0	1	1	2	1	0	2	2	17	2,15	26,1
1925	1	3	7	2	8	0	2	2	2	0	0	3	30	3,54	53,5
1926	1	2	0	0	3	3	5	2	3	3	1	0	23	2,53	60,5
1927	1	0	2	0	0	1	2	3	0	0	1	1	11	1,16	36,6
1928	1	0	1	2	5	2	0	2	3	2	1	0	19	1,89	51,3

Pela leitura desses quadros nota-se que o coefficiente de morbilidade por 100.000 habitantes é relativamente baixo: e aliás é o que geralmente se tem observado na maior parte das epidemias que se manifestam nas grandes cidades.

Os nossos quadros também mostram que se não observam surtos epidemicos salientes: ha apenas o estado endemico com frequencia maior de casos em certas occasiões.

Se a morbilidade é fraca, como acabamos de ver, em compensação a mortalidade tem sido bem accentuada, chegando no anno de 1926 a attingir a 60,5% dos doentes.

Comtudo, ainda aqui, não nos afastamos muito do que se observa em outras grandes cidades. Em média temos para a cidade de São Paulo 39% de casos fataes incluindo os não tratados, os tratados com sôro e os tratados *in extremis*. No Rio de Janeiro a lethalidade foi de 60,5%, média dos casos entre 1920-1926, e em Chicago, por exemplo, em estudo recentemente feito por John L. White (The Journ. of Prev. Med. n.º 1, 1929), sobre a meningite cerebro espinhal epidemica durante os annos de 1926 a 1928, houve, em 200 casos, 97 mortes, isto é, 48,6%.

2 — Factores meteorologicos

Como em quasi todas as partes do mundo, entre nós tambem a meningite cerebro espinhal epidemica dá preferencia aos mezes frios do anno. E' o que se pode ver nos quadros e graphicos que acompanham este trabalho e que assignalam a predominancia de casos no 2.º e 3.º trimestres.

E são esses dois trimestres os mais frios entre nós, observando-se o mesmo facto na cidade do Rio de Janeiro.

Apenas o mez de Novembro — mez geralmente quente — na média desses annos que estamos estudando, de 1921 a 1928, e na parte que se refere á morbilidade apresenta numero de casos superior ao dos mezes frios, isto devido a se terem dado 22 casos em Novembro de 1922, numero até hoje não attingido em nenhum outro mez.

Deve-se notar, comtudo, que se a maior morbilidade foi attingida na média dos mezes de Novembro, a mortalidade deixou de acompanhá-la na proporção que se pode ver entre a mortalidade e a morbilidade nos mezes frios. O graphico n.º 1 é demonstrativo nesse sentido.

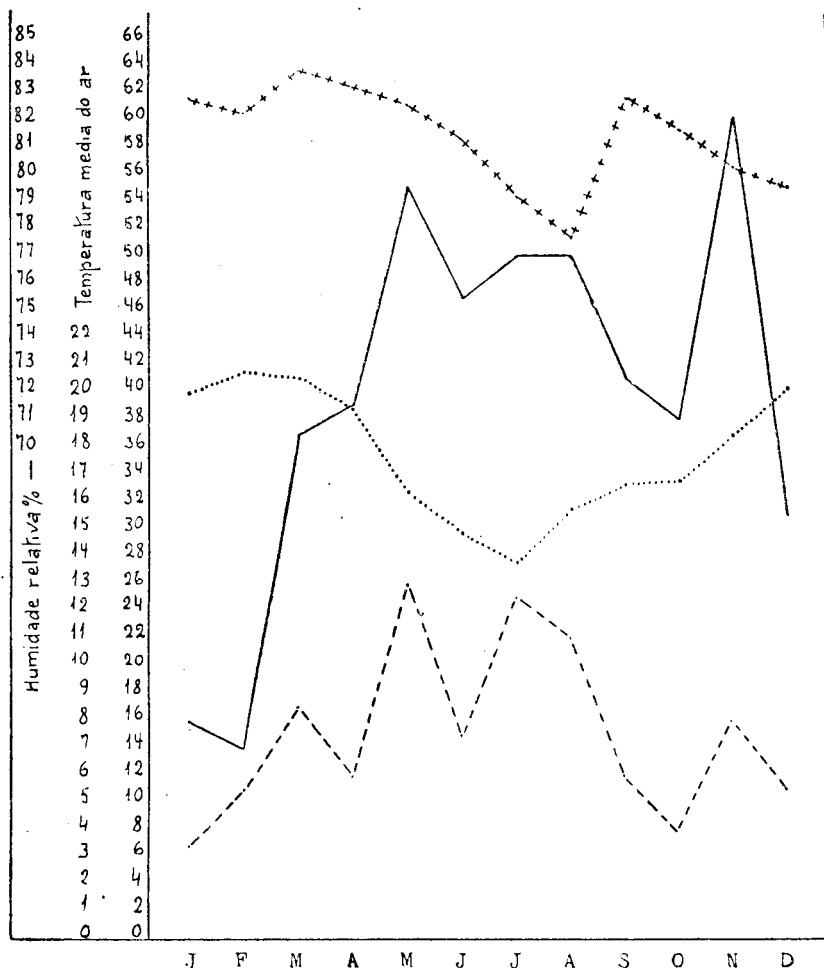
Na realidade — e isso já tem sido observado — ha maior gravidade da meningite cerebro espinhal epidemica nos mezes frios.

Arthur Compton apresentou nos Annaes do Instituto Pasteur de Paris, em 1918, um desenvolvido estudo sobre a meningite cerebro espinhal epidemica e seus factores meteorologicos em algumas cidades da Inglaterra (Weymouth, Dorchester e Bournemouth). O trabalho foi meticoloso, discutindo o apparecimento de cada caso (62 casos) em relação á humidade, temperatura, pressão atmospherica, chuva e sol, apresentando curvas diarias desses factores. Em 97% dos casos o apparecimento da molestia correspondeu á maxima da curva da humidade atmospherica e de preferencia quando se operava uma brusca elevação da humidade; e 91,5% dos casos foram associados á chuva, dos quaes 76% appareceram no mesmo dia da chuva ou no maximo 24 horas após.

GRAPHICO 1

Meningite Cerebro Espinhal Epidemica

Distribuição mensal da morbilidade e da mortalidade em relação á humidade relativa % e á temperatura média do ar, de 1921 a 1928, na cidade de São Paulo.



Morbilidade ———

Mortalidade — — — —

Humidade relativa % + + + + (medias mensaes — 921-928)

Temperatura media do ar » » » »

A humidade que **Compton** assignalou como factor meteorologico essencial para o apparecimento da meningite cerebro espinhal epidemica, é assumpto que ainda não tem sido bem estudado para que se lhe dê tamanho valor. Nas cidades onde **Compton** estudou os seus casos, esse factor foi importante, factor que tambem coincidio com o das chuvas.

Das influencias cosmicas a do frio é a que universalmente é admittida, embora em qualquer estação do anno se observem meningococcias.

Na Europa o frio sendo na epoca das chuvas e estas trazendo humidade, esses tres factores em muitas localidades concorrem para a eclosão das meningococcias.

Entre nós a epoca do frio não corresponde á das chuvas, vindo estas no tempo do calor: e a humidade, que geralmente tem relação com as chuvas, é menor nos mezes frios em S. Paulo, mezes estes em que se dá maior numero de casos.

Os mezes de Julho e Agosto são os menos humidos e mais frios do anno, no entanto a morbilidade e a mortalidade são das mais accentuadas. A menor humidade desses dois mezes não concorre para diminuir os casos, mas corresponde, pelo contrario, a uma forte elevação das curvas de morbilidade e mortalidade. Nos mezes de Maio e Junho as curvas elevadas dos casos estão sempre de accordo com a baixa da temperatura, mas aqui a curva da humidade é tambem elevada.

O frio, visivelmente, é o factor principal; e a humidade, pelo menos entre nós, poderá ser factor secundario.

Os mezes mais humidos são os mais quentes e aquelles em que ha abundancia de chuvas. O graphico n.º 2 mostra os tres factores meteorologicos principaes em relação com a mortalidade da meningite cerebro espinhal epidemica na cidade de S. Paulo, vendo-se que nos mezes em que a curva da mortalidade sobe, a das chuvas desce.

No estudo acima citado, de **A. Compton**, dos casos de meningite cerebro espinhal epidemica estudados 91,5 % foram associados á chuva, tendo 76% apparecido no mesmo dia da chuva ou no maximo 24 horas após.

O nosso estudo não acompanhou o apparecimento de cada caso em relação aos factores meteorologicos; assignala unicamente medias mensaes. Do graphico n.º 2 apenas podemos deduzir que nos mezes frios e em que ha menos chuvas é accentuada a lethalidade da meningite cerebro espinhal epidemica.

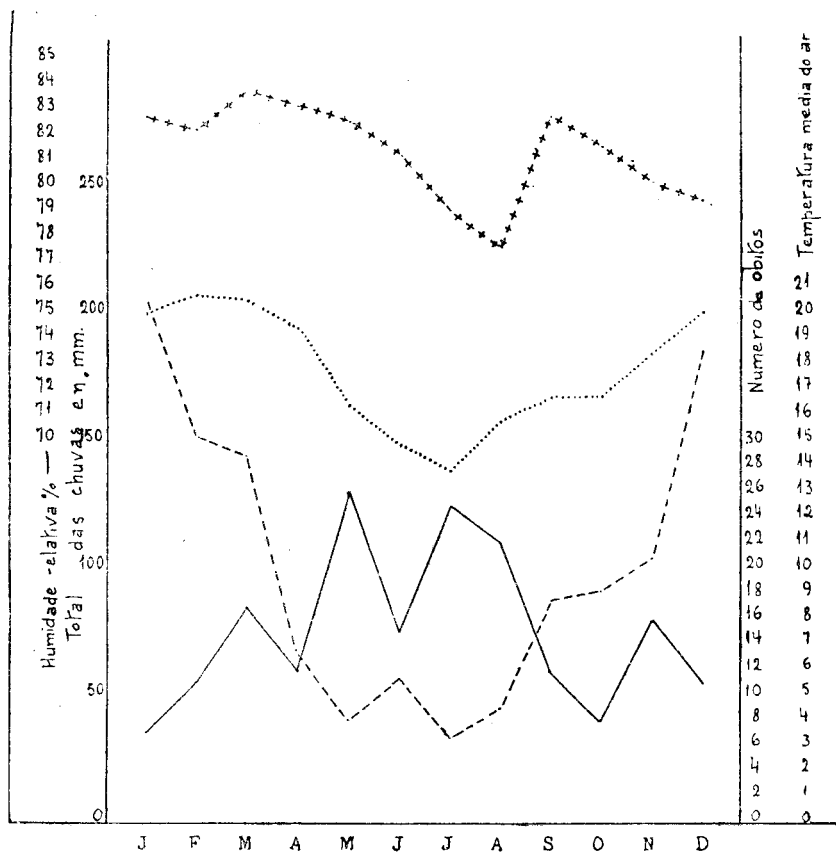
L. Laveran, **M. Lemoïn**, **Olitsky**, etc., e principalmente **Dopter** assignalam como factor importante as oscillações bruscas da temperatura, ás quaes o organismo é mais sensivel do que a de um frio continuo: "C'était habituellement le lendemain ou le surlendemain de ces variations importantes de la température que j'avais remarqué les poussées paroxystiques de

la méningite, telles qu'elles ont été décrites dans l'étude des caractères généraux des épidémies" (Dopter).

GRAPHICO 2

Meningite Cerebro Espinhal Epidemica

Distribuição mensal da mortalidade em relação á humidade relativa, á temperatura média do ar e ao total das chuvas em mm., de 1921 a 1928, na cidade de São Paulo.



Mortalidade —

Temperatura média do ar.... (médias mensaes—921-928)

Humidade relativa % + + + + » » » »

Total das chuvas em mm. — — — — » » » »

Um dos factores característicos do clima da cidade de S. Paulo é a oscillação brusca de temperatura, oscillação que muito concorre para a produção das rhino-pharyngites.

Está satisfatoriamente demonstrado que o primeiro ataque do meningococco é ao rhino-pharynge, produzindo a rhino-pharyngite, julgando muitos autores ser esse o mal de predilecção produzido pelo meningococco, que só secundariamente, como complicação, poderá invadir as meningeas e ser a causa de uma meningite, ou invadir o sangue e ser a causa de uma septicemia meningococcica pura, sem meningite.

II

ESTUDO BACTERIOLOGICO

1 — Identificação

A identificação de meningococcos deve ser feita em relação aos outros diplococcos similares.

Todas as Neisserias podendo produzir meningite — mesmo a *Neisseria gonorrhoeae* (gonococco) — tendo todas ellas caracteres morphologicos quasi iguaes e sendo Gram negativas, a identificação tem que ser feita tambem pelos caracteres culturaes e principalmente pela mais importante de suas propriedades biologicas, a fermentação dos hydratos de carbono.

A agglutinação pode auxiliar a identificação; mas é commum encontrar-se meningococcos inagglutinaveis quando recentemente isolados e que após muitas repicagens podem ser classificados em typos sorologicos, conservando outros a sua inagglutinabilidade. É a razão pela qual **Park** e **Williams** dizem que somos incapazes de classificar todos os meningococcos com segurança. Ha sempre uma certa porcentagem de meningococcos que se não classificam em nenhum typo sorologico e que vão formar o Grupo X, onde se reúnem raças de caracteres immunologicos individuaes, não se agglutinando com os soros dos typos conhecidos.

Mesmo com um soro polyvalente ha meningococcos que não são agglutinados, principalmente entre os recentemente isolados.

Os nossos diversos trabalhos sobre o assumpto confirmam o que acabamos de assignalar.

Portanto, principalmente pela fermentação dos hydratos de carbono é que se consegue fazer distincção entre os diplococcos Gram negativos, morphologicamente semelhantes aos meningococcos, commumente encontrados no rhino-pharynge — *Neisseria catarrhalis*, *sicca*, *perflava*, *flava* e *subflava*, — e com a *Neisseria gonorrhoeae*, que tambem pode produzir meningite da mesma forma que a *Neisseria intracellularis* (meningococco) pode no

curso de uma meningite produzir uma urethrite aguda, facto observado por **J. Dumont** e **Baron** (Bull. et Mem. Soc. Med. Hosp. de Paris — 1920).

Pela fermentação dos assucares pode haver duvida apenas entre as *Neisserias intracellularis* e *subflava*, ambas fermentando maltose e glycose. Mas as culturas ligeiramente amarelladas da *Neisseria subflava* (Grupo chromogenico III, de **Elser** e **Huntoon**), assim como a sua facilidade de vegetar em meios não albuminosos — o que se não dá com os meningococcus recentemente isolados — são caracteres que facilitam a distincção entre essas duas *neisserias*.

Entre todas as outras *neisserias*, a fermentação é diferente em cada uma dellas.

Podemos affirmar pela experiencia de termos lidado com algumas centenas de meningococcus, serem elles germens cuja fermentação não varia, o contrario do que se dá com os bacillos dysentericos. Nestes não é raro ver-se o typo “Y” transformar-se em “*Flexner*”, este em “*Sonne*” e “Y”, o typo “*Shiga*” em “*Sonne*” e “*Flexner*”, etc.

Conservamos meningococcus durante mais de 5 annos passando-os diversas vezes nos assucares, nunca observando alteração da fermentação, que é constantemente a mesma desde a data do seu isolamento.

2 — Fermentação

Principalmente quatro questões precisam ser bem estudadas quando se quer verificar a fermentação de hydratos de carbono com meningococcus e outras *neisserias*:

- a) — O indicador
- b) — Os hydratos de carbono
- c) — Acção da esterilisação sobre elles
- d) — A escolha do meio

a) — *O indicador* — O indicador que quasi todos os experimentadores teem usado como **Lingelsheim**, **Elser** e **Huntoon**, etc., é a *tintura de tornasol* cujo intervallo de viragem está comprehendido entre pH 5.0 e pH 8.0. Nós a usámos tambem no inicio dos nossos estudos sobre a fermentação de meningococcus, achando-a muito inferior ao vermelho neutro, principalmente para a leitura rapida em 6 a 8 horas, como fazemos para ganhar um dia na determinação da especie.

Sempre preferimos o *vermelho neutro* que nos tem dado constantemente melhores resultados e cuja viragem se dá entre pH 6.8 e pH 8.0. Toma-se uma solução aquosa a 1% de vermelho neutro, juntando-a na proporção de 1% ao meio com pH 7.2, ficando o meio amarello alaranjado: á medida que o germen

vae acidificando o meio, este se torna mais avermelhado; se o germem alcalinizar o meio, o tom amarello alaranjado inicial vae gradativamente mudando, accentuando-se o tom amarello.

Com o *acido rosolico*, cujo intervallo de viragem está entre pH 6.9 e pH 8.0, usado em solução de 1% em partes iguaes de agua e alcool e juntado ao meio na proporção de 1% dessa solução, os resultados que obtivemos foram muito inferiores ao do vermelho neutro: a vegetação dos meningococcus nos meios com acido rosolico é retardada e muito escassa, notando-se uma regular acção impiediente para com os meningococcus, o que se não observa para com outras neisserias menos exigentes, como se pode ver no quadro n.º 1.

Com germens do grupo coli-typhico-dysenterico é ao acido rosolico que geralmente damos preferencia como indicador, usando a mesma solução, mas na proporção de 2 c. c. para 100 do meio, portanto, o dobro da experimentada no nosso quadro para as neisserias.

Com o *acido rosolico*, quando o germem fermenta o meio este torna-se esbranquiçado, com alguns tons pardo amarells. O meio, que é avermelhado, conserva-se nessa côr, accentuando-a mais quando o germem não o fermenta.

Experimentamos tambem o *vermelho phenol* (phenolsulfo-phtaleina), cujo intervallo de viragem está entre pH 6.8 — 8.0.

Com o *vermelho phenol* os resultados foram bem melhores do que com o acido rosolico: não impede tanto o desenvolvimento dos meningococcus, sendo a leitura muito facil, ficando o meio amarello canario, quando fermentado, conservando-se vermelho no caso contrario.

Usamos o *vermelho phenol* juntando-o na proporção de 3,5 c. c. de uma solução aquosa a 0,04%, para 100 c. c. do meio, e este sempre com a mesma reacção pH 7.2.

A seguir damos um quadro com o protocollo dos ensaios feitos com o nosso meio.

QUADRO I

	Gelose sôro pH 7.2 Indicador: <i>acido rosolico</i>								Gelose sôro pH 7.2 Indicador: <i>vermelho phenol</i>								Gelose sôro pH 7.2 Indicador: <i>vermelho neutro</i>							
	6 horas		9 horas		24 horas		48 horas		6 horas		9 horas		24 horas		48 horas		6 horas		9 horas		24 horas		48 horas	
	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose
Neisseria intra-cellularis 371	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	+	-	++	-	++
Neisseria intra-cellularis 423	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	+	-	++	-	++
Neisseria intra-cellularis 425	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	+	-	++	-	++
Neisseria perflava n.º 589	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++
Neisseria flava n.º 279	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++

- Ausencia de fermentação.

+ Início de fermentação.

+ Fermentação.

++ Forte fermentação.

Da leitura do quadro n.º 1 pode-se deduzir que dos indicadores experimentados, e nas condições dos nossos ensaios, foi o *vermelho neutro* que se mostrou mais sensível, sendo a elle que damos preferencia, vindo em seguida o *vermelho phenol* e por ultimo o *acido rosolico*, que não convem ser empregado.

b)-*Os hydratos de carbono*. Commumente são usados na identificação de meningococcus e outras neisserias os seguintes hydratos de carbono: maltose, glycose, levulose, saccharose e lactose. Esses assucares são indispensaveis numa identificação, podendo-se augmentar a serie com mais galactose, manita, dextrina, dulcita e inulina, que não devem fermentar com nenhuma neisseria.

Não ha a menor discordancia de opiniões (**Elser e Huntoon, Dunham, Lingelsheim, Kutsher, Gordon, Arkwright**, etc.) referente á acção fermentativa dos meningococcus sobre a maltose e glycose. Os meningococcus fermentam maltose e glycose.

Já surgem divergencias em se tratando da acção dos meningococcus sobre a levulose, galactose e dextrina. Nós nunca observamos a fermentação desses hydratos de carbono com meningococcus e já ha muitos annos que constantemente isolamos e identificamos esses germens. Deve-se considerar que as divergencias existentes nesse sentido foram possivelmente devidas ao meio usado, qualidade do assucar, sua esterilisação, etc.

Em meio solido, todos os trabalhos que temos visto são uniformes em declarar a não fermentação desses assucares. Não assim com os meios liquidos: nestes, diversos investigadores (**Dunn, Gordon, Aridrewes, Arkwright**, etc.) assignalaram que os meningococcus fermentam a galactose; com a levulose e a dextrina, outros têm observado fermentação.

c) — *Acção do aquecimento sobre os hydratos de carbono*. Os resultados são desiguaes para um mesmo meningococco, ou outra qualquer neisseria, com o mesmo assucar e o mesmo meio se o tempo de esterilisação ou de aquecimento do meio variar muito. Os assucares, como é sabido, não supportam um forte aquecimento sem se alterar, sendo mesmo possivel que se alterem mais em uns meios que em outros.

As experiencias de **Elser e Huntoon** feitas com levulose e galactose são claras nesse sentido. Usaram meio liquido: agua peptonada nutrosada, com o assucar a experimentar. A esterilisação foi feita: uns tubos 10' a 100°C; outros, 10' a 100°C tres dias consecutivos. Verificaram, passando para esses meios diversos meningococcus e coccus Gram negativos pertencentes aos grupos chromogenicos, que a esterilisação intermitente alterou por completo esses assucares ou a reacção do meio, fazendo com que os resultados fossem quasi todos falsos, havendo em geral fraca fermentação onde ella normalmente não se dá.

Como lidamos sempre com meio solido, tambem fizemos algumas experiencias com elle e damos a seguir os protocollos.

Escolhemos para essa prova em primeiro lugar a levulose, por ser um assucar importante na identificação desses coccus Gram negativos: das neisserias que fermentam a maltose e a glicose só as neisserias intracellularis e subflava é que não fermentam a levulose.

Tambem a mesma experiencia foi feita com a maltose.

Como se pode ver no quadro n.º 2, não houve alteração dos assucars na esterilisação a 100°C durante 10'; na esterilisação intermitente tres dias consecutivos a 100°C durante 10', tambem não houve alteração, ao passo que **Elser** e **Huntoon**, nas mesmas condições, mas em meio liquido, observaram alteração da levulose e galactose; na esterilisação durante 30' a 100°C o nosso quadro mostra a alteração da levulose, que após ter sido fermentada com as neisserias perflava e flava nas primeiras 48 horas, como aliás deve ser, passa no terceiro dia a dar fermentação negativa.

Deve-se levar em conta, ainda, a qualidade do assucar, que depende dos fabricantes.

d) — *A escolha do meio* — Quanto á escolha do meio, convem de inicio deixar affirmado que de preferencia devem ser usados meios solidos. Todos os meios liquidos teem mais ou menos os mesmos inconvenientes. Os meningococcus vegetam nelles muito lentamente, levando alguns dias para dar cultura apreciavel, quasi sempre sendo impossivel verificar-se a fermentação mesmo em 48 horas.

Deve-se tambem considerar que, embora raramente, são encontrados assucars vindo já contaminados dos fabricantes, com germens esporulados, não vegetando esses esporos nem em 48 horas na estufa.

Qualquer outra contaminação dos meios liquidos só pode ser tambem verificada pelos meios habituaes, em preparações coradas, etc. Ao passo que nos meios solidos e principalmente semeados pelo nosso processo, a simples inspecção já indica se o meio está ou não contaminado.

Costumamos usar meio solido inclinado, em tubos pequenos de hemolyse, de 120/12 mm.; semeamos o material no meio do tubo, espalhando-o de maneira circular (*fig. 1*). Fica, assim, a maior parte do meio livre de material, servindo para o seu controle. Tambem assim conseguimos, devido á grande quantidade de material usado em pequena superficie, uma fermentação nitida em seis horas com esse meio. E isso é de grande importancia pela necessidade que ha de uma identificação rapida.

O nosso meio é preparado de maneira muito simples: põe-se em cada balão (um balão para cada assucar), 80 c. c. de gelose commum a 3%, fundida e preferivelmente de preparo recente, com pH 7.2 a 7.4, junta-se 1 gr. do assucar (1%) e 1 c. c. da solução a 1% de vermelho neutro. Esterilisa-se em vapor

QUADRO 2

	Esterilização em 10' a 100° C. Uma vez										Esterilização em 10' a 100° C. 3 dias consecutivos										Esterilização em 30' a 100° C. Uma vez									
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		1 Semana		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		1 Semana		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		1 Semana	
	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose	Levulose	Maltose
Neisseria intracel- lularis n.º 26 l. c. r.	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Neisseria intracel- lularis n.º 42 l. c. r.	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Neisseria intracel- lularis n.º 40 l. c. r.	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Neisseria intracel- lularis n.º 16 l. c. r.	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Neisseria intracel- lularis n.º 75 l. c. r.	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Neisseria perflava n.º 589 l. c. r.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neisseria perflava n.º 522 g.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neisseria perflava n.º 51 g.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neisseria flava n.º 279 n.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neisseria catarrha- lis n.º 154 g.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neisseria catarrha- lis n.º 472 g.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

l. c. r. — Isolada do liq. ceph. rach.
g. — " da garganta.
n. — " do nariz.

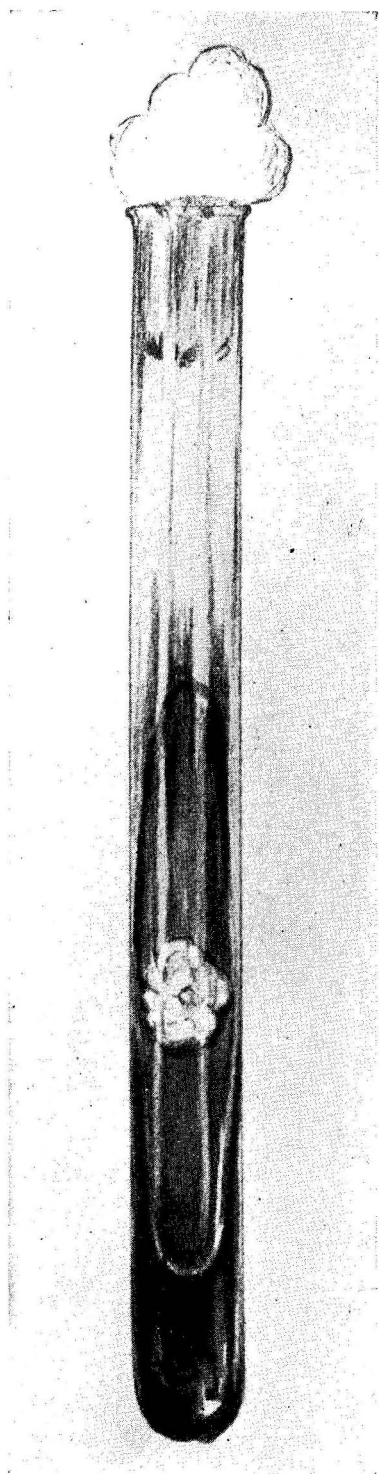


fig. 1

fluente durante 15', junta-se a cada balão 20 cc. de soro normal de cavallo (technica gelose soro); distribue-se com todo o cuidado, com pipeta esteril, em tubos estereis de 120/12 mm.; enclinam-se os tubos deixando o meio estriar. Verificar a esterilidade em 48 horas na estufa.

Semeados o material da maneira acima indicada, a fermentação já é bastante nitida para ser lida em seis horas, accentuando-se mais nos dias seguintes.

É indispensavel que o meio fique de côr amarello alaranjado: se estiver muito accentuado o tom vermelho, convem alcalinizar o um pouco; se muito amarelado, o meio está demais alcalino, convindo corrigir.

No ponto optimo, que sempre obtemos, em seis horas a fermentação é nitida com abundante vegetação do germen.

A fermentação caracteriza-se pelo tom vermelho alaranjado que se vae accentuando cada vez mais; com os assucars que não são fermentados o meio vae ficando cada vez mais amarello. A reacção, portanto, de dia para dia vae se tornando mais nitida.

3 — Typos de Meningococcus

Em diversos trabalhos, publicados nas "Memorias do Instituto de Butantan", temos estudado os meningococcus por nós isolados, servindo esses trabalhos como contribuição ao estudo dos typos de meningococcus encontrados no Brasil, sendo elles os primeiros feitos entre nós nesse sentido.

Quasi todos os meningococcus desses trabalhos foram obtidos dos casos de meningite cerebro espinhal da cidade de S. Paulo, raros de casos do interior do Estado.

Em 1922 tomámos 33 meningococcus e fizemos o primeiro estudo, submettendo-os á agglutinação com sôros diagnosticos americanos correspondendo aos typos I, II e III recebidos dos "Laboratories and Research, N. Y. State Dept. Health" e com sôros francezes correspondentes aos typos A, B, C e D recebidos do Instituto Pasteur de Paris.

Pudémos então constatar, como se vê no graphico 3, que com os sôros francezes 48,4% desses meningococcus não foram agglutinados, 27,2% corresponderam ao Typo A, 3% ao Typo B e 21,2% agglutinarão a titulo quasi egual com os soros A e B.

Com os soros americanos foram encontrados 30,3% de raças inagglutivaneis, 48,4% correspondendo ao Typo I, 18,1% ao Typo III, 3% agglutinando com os soros I e III, e nenhuma com o soro II.

Verificámos que quasi todas as raças agglutinadas pelo soro A francez, tambem o foram pelo soro I americano, correspondendo mais ou menos esses dois typos, e que são entre nós os mais commummente encontrados.

Em 1924 fizemos a classificação em tipos de 30 meningococcus isolados de casos de meningites desse anno, submettendo-os a sôros correspondendo aos Typos I, II e III da America do Norte, resultando verificar-se a predominancia de casos Typo I, com 53,3%. Em 1925 tambem houve a predominancia do Typo I, com 66%; e em 1926 ainda a predominancia do Typo I.

Note-se no graphico 3 a grande porcentagem de raças inagglutinadas com esses sôros, para o que concorreram dois factores: primeiro, o ser provavel entre nós existirem outros tipos sorologicos alem dos experimentados com os soros francezes e americanos; segundo, a pouca agglutinabilidade de muitos meningococcus quando recentemente isolados.

Sobre o primeiro factor foi iniciado por nós o seu estudo, não nos sendo possivel ainda terminar; quanto ao segundo, os nossos trabalhos anteriores deixaram provado á sociedade: a) que alguns meningococcus são inagglutinaveis quando recentemente isolados; b) que alguns desses meningococcus inagglutinaveis quando recentemente isolados, após algum tempo de repicagem e conservação, tornam-se agglutinaveis, podendo então ser classificados.

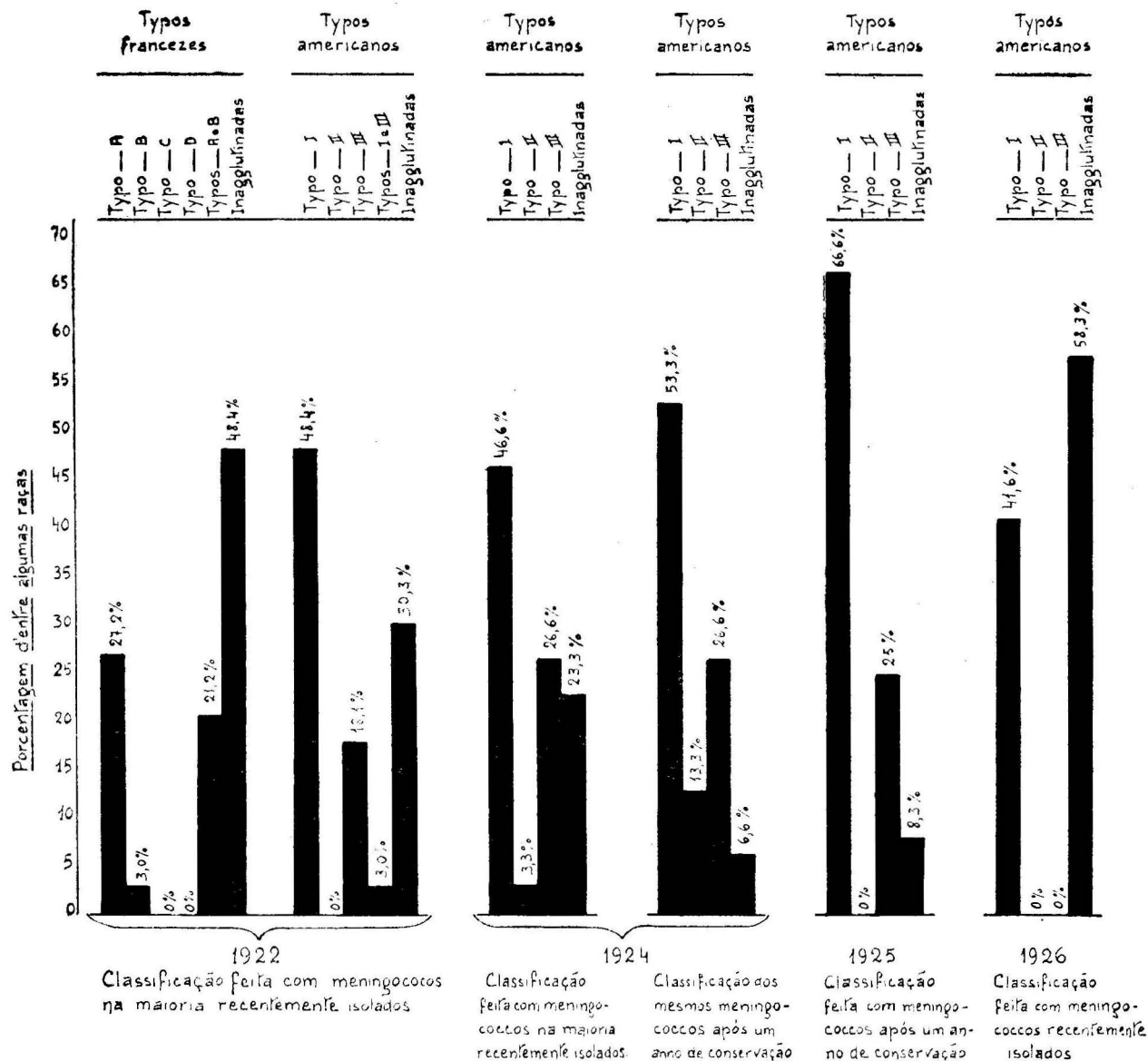
Veja-se no graphico 3 a classificação dos meningococcus isolados em 1924 que, quando feita com os germens mais ou menos recentemente isolados — de alguns dias ha um mez — deixou 23,3% (dos 30 meningococcus em estudo) no Grupo X, por não terem sido agglutinados; ao passo que os mesmos meningococcus, com sôros identicos e de titulo approximadamente igual, mas um anno após, deixaram no grupo das raças inagglutinadas apenas 6,6% sem classificação.

Os meningococcus isolados no anno de 1925 foram classificados mais ou menos um anno depois de isolados, dahi o não se encontrar senão 8,3% de raças sem classificação; ao passo que os meningococcus de 1926 foram sendo classificados á medida que os iamõs isolando, razão pela qual se vê no graphico desse anno 58,3% de raças inagglutinadas.

Em media, mais ou menos 30% dos meningococcus por nós estudados nos diversos trabalhos sobre o assumpto ficaram sem classificação. Entre estes é possivel que existam alguns que formem tipos sorologicos distinctos dos experimentados, como acima dissemos; comtudo, convem assignalar que pouco mais ou menos essa porcentagem tem sido encontrada em diversos Paizes, pela maioria dos bacteriologistas que tem procurado classificar os meningococcus em tipos sorologicos.

O que os bacteriologistas geralmente fazem é classificar os meningococcus baseando-se nas recommendações da Organização de Hygiene da Sociedade das Nações: a) uma divisão primaria em grupos que serão designados por numeros como, por exemplo: I, II, etc.; b) uma subdivisão dos grupos principaes em grupos secundarios ou tipos I a, II b, etc.). A divisão primaria

GRAPHICO 3



em grupos será baseada exclusivamente sobre a agglutinação ; a secundaria, em reacções de agglutinação e absorpção com sôros monovalentes ; e as culturas cuja identificação não fôr possível, serão classificadas no Grupo X.

4 — Conservação

Ha muitos processos e diversos meios especiaes para a conservação de meningococcus, mas a nossa experiencia tem demonstrado que os meios commummente usados, como gelose ascite, gelose sôro, gelose sangue, dão magnifico resultado, podendo os meningococcus ser conservados em media 5 a 6 mezes, sem transplantes, seguindo-se a technica por nós usada.

Sabe-se que os meningococcus são germens de pouca vitalidade mesmo nos meios de cultura apropriados e conservados na estufa, sendo a principal causa a sua fraca resistencia á dessecação.

Quanto á sua conservação na estufa a 37°, nada ha a modificar desde a primitiva observação de **Weichselbaum** (1903).

Morax (1918), em estudos que fez sobre a conservação de gonococcus verificou ser possível a sua conservação na estufa durante seis mezes, sem novos transplantes, usando gelose ascite, semeando os gonococcus em picada e fechando o tubo com uma capsula de borracha, para evitar a dessecação do meio, que permanecia na estufa.

Assis (1923), entre nós, fazendo experiencias de meningococcus plantados á **Morax**, em picada, em gelose-ascite, fechando os tubos para evitar a evaporação, e os guardando na estufa, verificou que se conservaram seis mezes. Passou depois a usar outra technica, cobrindo a picada após 24 horas de estufa com oleo de vaselina, confirmando as experiencias de **Michael** (1921), sobre a vitalidade de germens conservados sobre esse oleo. As culturas conservaram-se por mais de 100 dias.

Nós tambem já ha muitos annos que conservamos não só meningococcus como todos os outros germens em picada e cobertos com oleo de vaselina, mesmo os germens que se guardam fóra da estufa e de maior vitalidade.

No nosso clima tropical a evaporação dos meios de cultura é grande, desseccando rapidamente os meios que se acham na temperatura ambiente, o que o oleo de vaselina evita.

Actualmente a collecção de culturas do Instituto de Hygiene, a nosso cargo, é toda conservada sob oleo de vaselina.

As nossas culturas de meningococcus são conservadas sob oleo de vaselina, em gelose-sôro, por nos ser mais facil obter sôro do que ascite. Os mesmos resultados, quanto á conservação, obtivemos com gelose sangue de cavallo e de car-

neiro (preferivelmente sangue desfibrinado): juntamos 1 de sôro para 4 de gelose e 1 de sangue para 5 a 6 de gelose. A reacção desses meios é ajustada á pH 7,2.

A seguir damos os protocollos de algumas experiencias que fizemos com o fim de verificar o maior tempo de conservação da vitalidade de meningococcus em gelose sôro, gelose sangue de cavallo e gelose sangue de carneiro:

Quadro 3

Tempo de vitalidade de meningococcus semeados em picada e cobertos com oleo de vaselina após 24 horas na estufa, onde permanecem.
Reacção do meio: pH 7.2

Indicação do meningococco	Meio de cultura usado	Tempo de conservação
D. W. 60 (Typo I)	Gelose sôro de cavallo	210 dias
D. W. 60 (Typo I)	Gelose sangue de cavallo	210 dias
D. W. 60 (Typo I)	Gelose sangue de carneiro	190 dias
D. W. 60 (Typo I)	Gelose sangue de coelho	140 dias
218 (Typo I)	Gelose sôro de cavallo	103 dias
95 (Typo I)	Gelose ascite	150 dias
95 (Typo I)	Gelose sangue de coelho	153 dias
A. 46 B. (Typo II)	Gelose sôro de cavallo	183 dias
C. W. 30 B (Typo III)	Gelose sôro de cavallo	193 dias
Pedroso (Typo III)	Gelose sôro de cavallo	135 dias
29 (Typo III)	Gelose ascite	153 dias
29 (Typo III)	Gelose sangue de coelho	153 dias
225 (Grupo X)	Gelose sôro de cavallo	124 dias
755 (Grupo X)	Gelose sangue de coelho	70 dias

Portanto, sob oleo de vaselina e sem fechamento especial dos tubos a conservação foi de 2 a 7 mezes, na estufa. Convem assignalar que não houve sensíveis diferenças entre os meios usados, podendo-se utilizar indifferentemente de sôro, ascite ou sangue desfibrinado de cavallo, carneiro ou coelho. No nosso protocollo a gelose sangue de cavallo conservou a vitalidade das raças experimentadas um pouco mais do que as gelose sangues de carneiro e coelho. Possivelmente isso foi apenas devido a que os nossos meningococcus antes desse ensaio eram conservados em gelose sôro de cavallo, que é o meio por nós usado.

Não experimentamos gelose glycosada sôro, embora sabamos que a glycose juntada aos meios para o cultivo de meningococcus favorece o seu desenvolvimento, mas ás vezes o grande desenvolvimento de um germen é prejudicial á sua conservação; assim: os pneumococcus, quando semeados em caldo

glycosado sôro, vegetam tão abundantemente que o meio torna-se leitoso, podendo morrer em poucos dias, ao passo que se conservam longamente só em caldo sôro, embora vegetem muito menos.

Nas culturas de meningococcus em picada os germens desenvolvem-se quasi que só na superficie, como aerobios que são; mas, depois de coberta a cultura com oleo de vaselina, ella se estende, continuando a vegetar, até attingir as bordas do tubo, o que leva muitos dias.

Dos meningococcus do quadro acima, D. W. 60 (Typo I), A. 46 B (Typo II) e C. W. 30 B (Typo III) foram recebidos dos Estados Unidos e correspondem a esses tipos de meningococcus que parecem ser os mais communmente encontrados na America do Norte, sendo todos os outros isolados aqui em São Paulo, estudados e classificados nos nossos trabalhos anteriores, publicados nas Memorias do Instituto de Butantan.

5 — Outras Meningites Microbianas

De accôrdo com a nomenclatura internacional das doenças (*Classificação Bertillon*), as meningites microbianas não sendo meningococcicas nem tuberculosas vão reunidas na rubrica Meningite, ou como complicações de outras doenças.

Portanto, só pelos attestados de obitos é que poderíamos estudar o numero de meningites pneumococcicas, estreptococcicas, typhicas, etc., que são na maioria das vezes secundarias.

Tivemos occasião de apresentar no anno atrazado, á Sociedade de Biologia e Hygiene, um trabalho, ainda não publicado, como contribuição ao estudo bacteriologico das meningites em São Paulo.

Nesse trabalho só nos referimos aos casos de meningites por nós examinados no Posto Bacteriologico do Instituto de Butantan, no curso de um anno — de Agosto de 1925 a Agosto de 1926.

No correr desse tempo tivemos 49 exames positivos, dos quaes 36 (73,4%) foram de meningite meningococcica, 5 pneumococcica (10,0%), 3 typhica (6,1%), 2 a B. de Pfeiffer (4%), 1 estreptococcica (2%), 1 tuberculosa (2%) e 1 a Neisseria perfilava (2%). Os germens de todos esses casos foram isolados por nós do liquido cephalo-rachidiano.

Só diremos alguma cousa sobre os cocco-bacillos de Pfeiffer isolados, por ser assumpto mais interessante.

Trata-se de dois casos mortaes. Os liquidos examinados eram francamente purulentos, dando ao exame directo o seguinte resultado: o do 1.º caso — cocco bacillos muito curtos, Gram negativos, alguns intra cellulares, raras formas filamentosas, abundantes polynucleares alterados e raras cellulas endothelias; o do 2.º caso — ao exame directo apresentava um enor-

me pleomorphismo a ponto de quem estivesse pouco habituado a lidar com esse germem julgar tratar-se de contaminação. Viam-se cocco-bacillos curtos, Gram negativos, intra e extra cellulares e corando-se mal, alguns mais alongados e *principalmente o predomínio de formas filamentosas*, com longos filamentos muito recurvados, parecendo ás vezes cadeias de diplococcos, mas sempre Gram negativos e recebendo mal as côres de anilina; abundantes polynucleares alterados.

Esses dois liquidos foram semeados, como todos os liquidos que recebemos para exame bacteriologico, em tres tubos: gelose sôro, gelose sangue de coelho e caldo sôro. Deram culturas puras de germens com os caracteres morphologicos e de colorabilidade que acabamos de assignalar *mas só nos meios com sangue*, nada se observando nos outros meios. Mesmo nos meios com sangue a cultura foi tão delicada que custava a ser vista, sendo muito mais fina do que a de estreptococco ou de pneumococco.

As culturas foram passadas em placas de gelose sangue das quaes isolámos quatro colonias de cada uma, todas ellas dando culturas uniformemente semelhantes ás culturas iniciaes, não nos ficando duvidas sobre tratar-se de cultura pura.

Na antiga classificação de **Levinthal** o B. de Pfeiffer do primeiro caso poderia ser classificado no grupo 2, e o outro no grupo 3.

A divisão ou classificação em grupos morphologicos de **Levinthal**, dos Bacillos de Pfeiffer, era a seguinte: 1 — cocco bacillos curtos, finos, muito regulares; 2 — formas um pouco alongadas entre as quaes já se encontram alguns elementos filamentosos; 3 — pleomorphismo muito accentuado, com predominancia de formas alongadas ou filamentosas; 4 — caracteres morphologicos analogos aos do 3.º grupo, mas o germem tem a propriedade hemolytica.

Conservámos esses bacillos de Pfeiffer até hoje e mais alguns que temos isolado do liquido cephalo rachidiano de outros casos de meningite pfeifferiana, alguns delles já ha quasi dois annos.

A conservação desses germens não é muito facil.

Os meios que melhor resultado nos deram foram os encontrados nos trabalhos italianos.

Ha alguns annos, o Laboratorio Bacteriologico de Saúde Publica de Roma resolveu fazer uma revisão sobre a questão do B. de Pfeiffer e as suas relações com a pathogenese da gripe, onde estudaram diversos meios, entre os quaes citamos os seguintes por serem os que nos deram melhores resultados:

1 — Gelose commum (agar 3% pH 7,6) fundida em banho maria fervendo; misturar em seguida, sem deixar esfriar, 2 a 3% de sangue desfibrinado de coelho, ou de cavallo, carneiro, homem; collocar o meio novamente no banho, sem fogo, durante um minuto.

2 — Meio liquido. Tomar caldo commum (pH 7,6), aquecel-o de 95 a 100° e juntar 2 a 3% de sangue desfibrinado; deixar repousar o sangue coagulado e decantar asepticamente o liquido.

3 — **Cardarolla** aconselha o seguinte meio (*que é o que mais commumente temos usado, e no qual sempre observamos maior vegetação do B. de Pfeiffer*): aspirar com uma seringa esterilisada algumas gottas de agua peptonada a 1%, sem sal, para impedir a coagulação do sangue; aspirar da veia axilar de um pombo 2 cc. de sangue; diluir immediatamente o sangue aspirado em 18 cc. de agua distillada contendo 1% de peptona e em seguida misturar 2 cc. dessa agua peptonada e sangue em cada tubo com 8 cc. de gelose commum a 3% fundida. Manter finalmente o meio durante 1 hora a 60°C.

Em qualquer desses meios conservamos os nossos bacillos de Pfeiffer, repicando-os de 15 em 15 dias, sendo que, quando recentemente isolados requerem repicagens quasi diarias.

Aconselham ser preferivel conservar esses germens fóra da estufa por serem muito sensiveis ao desseccamento do meio.

Na estufa resistem bem uns 7 dias ou pouco mais. Sob oleo de vaselina nós os conservamos transplantando-os de 30 em 30 dias. Podem tambem ser conservados em simples gelose sangue de coelho onde, comtudo, a vegetação é muito escassa, quase invisivel em 24 horas. Em qualquer meio, cobrindo-se a cultura com oleo de vaselina a conservação é muito mais prolongada.

Tentámos verificar a fermentação de assucares com esses dois cocco-bacillos de Pfeiffer.

Ha grande difficuldade nessa verificação. Precisando-se juntar sangue aos meios, torna-se difficil a leitura. E' a razão pela qual os trabalhos dos bacteriologistas divergem tanto uns dos outros. Sobre o assumpto podemos citar as seguintes opiniões: **Cardarolla** e **Zanelli** acham que os legitimos bacillos de Pfeiffer fermentam, embora não intensamente, a glycose, maltose e levulose; **Levinthal** só encontrou ligeira fermentação na glycose e resultado negativo na maltose e levulose; **Messerchmidt**, fermentação da glycose, algumas raças fermentando e outras deixando de fermentar a maltose e não fermentação da lactose, saccharose e mannita; **Stillmann** e **Bourne**, fermentação da glycose, levulose, maltose e saccharose, sendo que, com os dois ultimos assucares encontraram algumas raças que fermentam e outras não; **Thjotta**, fermentação da glycose e ausencia de reacção na maltose, saccharose, lactose e mannita.

O unico hydrato de carbono em que mais ou menos confluem as opiniões sobre a fermentação é a glycose, mas assim mesmo **Malone** achou raças que fermentam e outras que não fermentam esse assucar, o mesmo acontecendo com **Povetzky** e **Denny**.

Diante de tantas discordancias não verificamos a fermentação das nossas raças.

Em resumo: esses dois germens eram cocco-bacillos, de 2 a 2,0 microns de tamanho, simples, em pares, em cadeias ou n formas filamentosas; immoveis. Gram negativos. Só crescem em meios com sangue, na estufa, não dando cultura em meios communs. As culturas eram tão delicadas como as de estreptococcus e pneumococcus. Não hemolyticos.

São germens que podem ser grupados no genero *Hemophilus* e provavelmente trata-se da especie *Hemophilus influenzae* (B. de Pfeiffer), segundo a classificação de Bergey, conselhada pela Sociedade Americana de Bacteriologistas.

Não podemos deixar de acrescentar que o germen isolado do 2.º caso, semelhante á 3.ª forma da classificação de Levinthal — na qual o B. de Pfeiffer apresenta-se com predominancia de formas filamentosas, — após alguns annos de conservação apresenta actualmente muito menos filamentos.

Temos tambem em nossa colleção um germen isolado do q. cephalo-rachidiano de um caso mortal de meningite e que na occasião demos como provavelmente B. de Pfeiffer por se assemelhar ao dos nossos casos e só ter nascido nos meios com sangue.

Na occasião levamos em consideração a antiga classificação de Levinthal que admittia uma 3.ª forma com predominancia de formas filamentosas. Mas este germen tem-se mantido sempre, já ha alguns annos, apresentando só formas filamentosas, sem cocco-bacillos esparsos. Guardamos o germen que apresenta sempre o mesmo aspecto observado no exame directo e liq. ceph. rachidiano, donde fora isolado, pretendendo estudal-o com mais vagar, embora saibamos que as formas filamentosas do B. de Pfeiffer podem augmentar em meios pobres.

Em um caso em que só predominem formas filamentosas, como naquelle que acabamos de citar, fica-se na duvida se se trata de um cogumelo do genero *Cohnstrepithrix* (*leptothrix*) pois os filamentos não têm ramificações nem apparentes, nem verdadeiras (*actinomyces*). Sobre o assumpto diz William W. Ford na sua recente bacteriologia: “some strains do not show the typical morphology, but tend to grow in long thread looking like a *leptothrix*”.

Quando o B. de Pfeiffer é isolado do escarro e se apresenta em forma filamentosa deve-se levar em consideração que a bocca encontram-se normalmente representantes dos generos *Cohnstrepithrix* e *actinomyces*.

RESUMO

Parte Epidemiologica

A meningite cerebro espinhal epidemica installou-se e mantem-se na cidade de São Paulo sob a forma endemica, não apresentando surtos epidemicos salientes: ha apenas o estado endemico com frequencia maior de casos em certas occasiões.

O coefficiente de morbilidade por 100.000 habitantes é relativamente baixo; em compensação a mortalidade tem sido, ás vezes, bem accentuada, chegando no anno de 1926 a attingir a 60,5% dos doentes, mas a media dos annos de 1920 a 1928 dá apenas 39% de casos fataes incluindo os não tratados, os tratados com sôro e os tratados *in extremis*.

O trabalho focalisa os principaes factores meteorologicos capazes de influir entre nós na morbilidade e mortalidade da meningite cerebro espinhal, apresentando graphicos demonstrativos.

Entre nós tambem a meningite cerebro espinhal epidemica dá preferencia pelos mezes frios do anno, mas a época do frio não corresponde á das chuvas, vindo estas no tempo do calor; facto identico observando-se com a humidade — que geralmente tem relação com as chuvas — e que é tambem menor nos mezes frios.

Na Europa, sendo o frio na epoca das chuvas e estas trazendo humidade, esses tres factores em muitas localidades são citados como importantes e mesmo algumas vezes como essenciaes na eclosão das meningites meningococcicas.

Na cidade de São Paulo só o frio, pôde ser considerado como factor meteorologico importante.

Parte Bacteriologica

Identificação — Podendo todas as Neisserias produzir meningites, mesmo a Neisseria gonorrhea (gonococco), tendo todas ellas caracteres morphologicos quasi iguaes e sendo Gram negativas, a identificação deve ser feita tambem pelos caracteres culturaes e principalmente pela mais importante das suas propriedades biologicas — a fermentação dos hydratos de carbono.

A agglutinação pode auxiliar a identificação mas ha a questão de typos sorologicos de meningococcus, como tambem é commum encontrar-se meningococcus inagglutinaveis quando recentemente isolados.

Fermentação — O trabalho estuda minuciosamente o indicador, os hydratos de carbono, sua esterilisação e a escolha do meio. Dos indicadores o *vermelho neutro* foi o que deu melhores resultados e ao qual damos preferencia. O *acido rosolico*

mpede um pouco o crescimento de meningococcus; o *vermelho phenol* dá bons resultados, mas inferiores ao *vermelho neutro*.

Esterilisação de assucars — Na acção da esterilisação sobre os hydratos de carbono observámos que não houve alteração a 100°C. durante 10', o mesmo se dando na esterilisação intermitente tres dias consecutivos a 100°C., durante o mesmo tempo; ao passo que na esterilisação 30' a 100°C. houve alteração de levulose.

Meio — Quanto ao meio, preferimos meio solido. Nos meios liquidos a vegetação dos meningococcus é muito lenta, quasi sempre sendo difficil verificar-se a fermentação mesmo em 48 horas.

No meio por nós usado, semeando-se o material da maneira indicada, em 6 horas na estufa já a fermentação é nitida com meningococcus ou outra qualquer Neisseria.

Typos de meningococcus — O typo de meningococco predominante na cidade de S. Paulo desde 1924 tem sido o typo A, francez, que corresponde mais ou menos ao Typo I, americano (Laboratories and Research, N. Y. States Dept. Health); o Typo B é muito menos encontrado e os Typos C e D até hoje em nenhum caso foi revelado. Com os sôros americanos o Typo III vem em segundo lugar, sendo muito raro o Typo II.

Em média mais ou menos 30 % dos meningococcus por nós estudados em diversos trabalhos ficaram sem classificação com os sôros francezes e americanos usados, sendo possivel que entre elles alguns possam formar typos sorologicos que nos sejam proprios.

Conservação — Conservamos os meningococcus sob oleo de vaselina, em gelose sôro, onde podem permanecer vivos até 210 dias na estufa.

Estudamos tambem a conservação em gelose sangue de cavallo, de carneiro, de coelho e gelose ascite, sendo os resultados mais ou menos identicos.

Outras meningites microbianas — Só apresentamos o esudo dos casos examinados no Posto Bacteriologico do Instituto de Butantan no curso de um anno — de Agosto de 1925 a Agosto de 1926.

Em 49 exames positivos, 73,4 % foram de meningite meningococcica, 10 % pneumococcica, 6,1 % typhica, 4 % a Bacillo de Pfeiffer, 2 % estreptococcica, 2 % tuberculôsa e 2 % a Neisseria perflava.

O trabalho é desenvolvido na parte que se refere aos casos de meningite a B. de Pfeiffer. Um dos B. de Pfeiffer, tanto no exame directo do liquido cephalo rachidiano como nas culturas, apresentava cocco-bacillos curtos, Gram negativos, alguns mais alongados e mesmo predominancia de formas filamentosas asse-
nelhando-se a cogumellos do genero *cohnestreptotr*.

EPIDEMIOLOGIC AND BACTERIOLOGICAL STUDY OF EPIDEMIC CEREBRO-SPINAL MENINGITIS IN THE CITY OF S. PAULO, BRASIL

by *Dr. Lucas de Assumpção*

SUMMARY

Epidemiology

Cerebro-spinal meningitis has been observed and continues to appear in S. Paulo as an endemic disease. There has been no epidemic increase but only a greater number of cases in certain occasions.

The morbidity coefficient for 100.000 inhabitants is low, whereas the mortality has been at times rather high, reaching in 1926, 60.5% of the number of patients. However, the average for the years 1920-1928 is only of 39% fatal cases, including, untreated, serum treated cases, and cases treated only *in extremis*.

Tables are given showing the principal meteorological factors affecting the morbidity, and the mortality in this locality.

Here also the cerebro spinal-meningitis is more frequent in the winter, which in S. Paulo does not coincide with the rainy months, nor with the greater humidity of the air, both of which are observed in the warmer months.

In Europe, the cold comes in the rainy months, when the humidity is also greatest, and in many localities these three factors are noted as very important or even as essential to the appearance of meningococcus meningitis.

In S. Paulo the cold is the only factor which can be considered as of any importance.

Bacteriology

Morphological characters — Since all Neisserias are able to cause meningitis, even Neisseria gonorrhea (gonococcus), and since their morphological characters are almost identical and they are Gram-negative, it is best to classify them in accordance to their cultural characters and especially by means of the most important of their biological properties that of fermenting carbohydrates.

The agglutination test may help to differentiate these bacteria, but there is some doubt about the serological types of the meningococcus and it is possible to find non agglutinating meningococci when they have been recently isolated.

Fermentation — There is a careful study of the indicator, the carbohydrates, their sterilization and the choice of a medium. *Neutral red* was the indicator which gave the best results. *Rosolic acid* does not favour the growth of meningococci; *phenol*

ed gives good results, but somewhat inferior to those obtained with neutral red.

The sterilisation of the carbohydrates at 100°C. for 10m. or their intermittent sterilisation for 3 successive days at 100°C. produced no change in them, whereas sterilisation at 100°C. for 10m. caused a change in levulose.

Media — We prefer a solid medium. The growth is very low in a liquid medium and it is very difficult to observe fermentation even after 48 hrs.

The fermentation is quite clear with the meningococcus and any other *Neisseria* after 6 hrs. in the incubator, when the medium recommended is used, and when it is inoculated as indicated.

Types of meningococci — Since 1924 the type of meningococcus which is most frequently observed in S. Paulo is the French type A, which corresponds more or less to the American type II (Laboratories and Research N. Y. State Dept. of Health), Type B is observed much less frequently and no case of types C and D has been observed, up to date. With American sera type III comes in the second place and type II is very rare.

On the average, 30% of the meningococci observed, on different occasions, were left unclassified, either by means of the French or American sera used. It is possible that among these there are types peculiar to this locality.

Conservation — The meningococci were kept under vaseline oil in agar serum, and in this way they can be kept in the incubator for 210 days and retain their vitality.

The conservation of meningococci in horse-blood agar, in rabbit or sheep-blood agar or in ascitic fluid was tried and the results obtained were found to be about the same.

Other bacterial meningites — The only cases observed were those examined at the Bacteriological Post of the Butantan Institute during one year from August 1925 to August 1926.

From 49 positive examinations made, 73.4% were caused by the meningococcus; 10% by the pneumococcus; 6.1% by *Bert's bacillus*; 4% by *Pfeiffer's bacillus*; 2% by streptococci; 5% by *Neisseria perflava* and 2% were of tubercular origin.

The cases caused by *Pfeiffer's bacillus* were described more at length. In one of them the direct examination of the cerebro-spinal fluid as also the cultures showed not only the presence of Gram-negative cocco-bacilli as also that only longer-shaped types and even the predominance of filament like forms similar to those of fungi of the genus *Cohnestrepotrix*.
