

ESTUDOS SÔBRE INFECÇÕES CAUSADAS POR VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CRIANÇAS DE SÃO PAULO. II — ADENOVÍRUS: ISOLAMENTO E ESTUDO SOROLÓGICO

S. TAKIMOTO ⁽¹⁾, J. de ARAUJO ⁽²⁾, A. R. FISCHER ⁽³⁾,
C. H. O. MARTINEZ ⁽⁴⁾ e L. A. RIBEIRO do VALLE ⁽⁵⁾

RESUMO

Durante o período compreendido entre setembro de 1964 e agosto de 1967 foram feitas tentativas de isolamento de vírus a partir de material orofaríngeo obtido de 258 crianças de 0 a 2 anos, atendidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e que apresentavam infecções respiratórias agudas.

De 165 desses casos foram isoladas nove amostras de adenovírus (5,4%), sendo três do tipo 1, dois do tipo 2, e quatro do tipo 5.

Reações sorológicas realizadas com 69 pares de soros, mostraram aumento significativo do teor de anticorpos para adenovírus em quatro casos (5,7%).

Adenovírus não foram isolados e não foi verificado aumento do teor de anticorpos fixadores do complemento em nenhum doente com menos de 4 meses.

Em um único mês, novembro de 1964, foram isolados quatro adenovírus todos do tipo 5 e os outros no decorrer do estudo realizado. Os isolamentos feitos foram observados de casos que ocorreram predominantemente durante a primavera e verão.

INTRODUÇÃO

Inúmeros trabalhos foram realizados durante os últimos anos no sentido de esclarecer a etiologia das infecções respiratórias agudas em crianças. Diferentes vírus têm sido considerados como causadores de grande número dessas infecções. Dentre esses os adenovírus são considerados responsáveis pelas mais diversas doenças respiratórias, desde casos benignos de infecções respiratórias do tracto superior até casos graves e mesmo

fatais. Nessas infecções, os tipos 1, 2, 5 e 7 de adenovírus têm sido mais frequentemente isolados ^{1, 6, 10, 12, 20-25}.

Em nosso país, estudando crianças com infecções das vias respiratórias a partir de material obtido da rinofaringe, CARVALHO ⁴, em São Paulo, isolou dois adenovírus do tipo 1 e um outro adenovírus de tipo diferente dos tipos 1 a 7; BRUNO-LOBO & col. ³, no Rio de Janeiro, isolaram os tipos 1 e 7

Trabalho realizado na Secção de Virulogia da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz em colaboração com o Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e do Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz

(1) Biologista da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz

(2) Médico Assistente do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil

(3) Médico da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz

(4) Biologista da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz

(5) Médico, Chefe da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

de casos semelhantes. Fazendo cultura de amígdalas, CARVALHO⁴ isolou adenovírus dos tipos 1, 2, 5 e um outro adenovírus de tipo diferente dos tipos 1 a 7. De adenóides e amígdalas, BRUNO-LOBO & col.³ isolaram adenovírus dos tipos 1, 2, 5 e 7. CARVALHO⁴, VERONESI & col.²⁶, e PEREIRA & col.¹⁵ encontraram anticorpos para adenovírus em soros de pessoas de São Paulo e Rio de Janeiro, pertencentes a diferentes grupos etários.

O presente trabalho, parte de um estudo mais amplo^{14, 17}, foi realizado com o objetivo de se obter melhores esclarecimentos sobre a etiologia das infecções respiratórias graves que acometem freqüentemente as crianças em São Paulo.

Com essa finalidade, foram observadas 258 crianças de 0 a 2 anos de idade, apresentando infecções respiratórias diversas, atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período compreendido entre setembro de 1964 e agosto de 1967.

MATERIAL E MÉTODOS

O material orofaríngeo e a primeira amostra de sangue dessas crianças eram colhidos, na mesma ocasião, na fase aguda da doença. Uma segunda amostra de sangue era obtida, quando possível, pelo menos 14 dias depois.

Colheita de amostras — O material da orofaringe era colhido por meio de coletor de algodão seco e transferido para um tubo contendo 3 ml de solução de GLY, à qual tinham sido acrescentadas 1.000 U. de penicilina, 1.000 µg de estreptomicina e 100 µg de nistatina ou 25 µg de anfotericina B por ml.

Culturas de células — Foram utilizadas as linhagens de células HEp-2 e HeLa. Para o crescimento das células foi empregado o meio de Hanks enriquecido com 0,5% de hidrolisado de lactalbumina e 20% de soro de vitelo. Para a manutenção, foi utilizado o mesmo meio de Hanks com lactalbumina, mas com 5% de soro de galinha, exceto em algumas ocasiões em que era usado 5% de soro de vitelo.

Inoculação do material — Transportado para o laboratório, o material da orofaringe era imediatamente inoculado em culturas de células (HeLa e/ou HEp-2) que eram incubadas a 36°C. Culturas de células controladas, sem serem inoculadas, eram mantidas à mesma temperatura. O meio de manutenção era trocado de dois em dois dias. As culturas eram examinadas ao microscópio três vezes por semana, durante um período de 21 dias, ou até o dia em que fôsse observado algum efeito citopático. Nesse último caso eram feitas passagens em novas culturas celulares para observação e posterior identificação do possível agente citopatogênico. Se, em três passagens sucessivas não fôsse observado efeito citopático, o material inoculado era considerado negativo.

Preparação de soro-imune — Foi usado como antígeno, adenovírus do tipo 5 cultivado em células HeLa, mantidas em meio de Hanks nutritivo sem soro. Quando mais de 75% das células inoculadas apresentavam efeito citopático, as culturas eram congeladas e descongeladas por três vezes consecutivas e em seguida centrifugadas a 1.500 r.p.m. durante 15 minutos. O sobrenadante era inoculado por via endovenosa em coelho adulto, no volume de 1 ml. Igual volume de antígeno misturado com adjuvante de Freund era injetado na mesma ocasião por via intramuscular. Uma semana depois, era inoculado mais 1 ml de antígeno por via endovenosa. Duas semanas mais tarde, era injetada pela mesma via a dose final de reforço constituída por 1 ml de antígeno. O sangue era colhido uma semana depois.

Prova de fixação do complemento para identificação de adenovírus — Os antígenos, preparados a partir de culturas de células inoculadas com o vírus a ser identificado, conforme técnica descrita no item anterior, eram titulados frente a uma diluição conhecida de soro imune padrão.

A 0,1 ml de antígeno eram acrescentados 0,1 ml de soro imune padrão diluído contendo duas unidades fixadoras de complemento e 0,1 ml de soro de cobaia contendo duas unidades de complemento. Esses elementos eram deixados em contato durante a noite a 4°C, e em seguida incubados a 37°C em

banho-maria, durante 15 minutos. Nesse momento, era acrescentado o sistema hemolítico, no volume de 0,2 ml, contendo duas unidades de hemolisina e hemácias de carneiro a 2%. Mantidos à temperatura de 37°C por mais 30 minutos, era então feita a leitura dos resultados.

Reações sorológicas de fixação do complemento — As reações de fixação do complemento eram realizadas com duas unidades de antígeno preparado com adenovírus tipo 5.

Os soros dos pacientes, separados logo após a colheita e conservados a -20°C, eram usados em diluições seriadas a partir de 1/8. Eram consideradas positivas as diluições em que não era observada hemólise.

Prova de neutralização para identificação do vírus isolado — Após pelo menos cinco passagens em culturas de células, o vírus a ser identificado era dosado e convenientemente diluído de modo que 0,1 ml de suspensão contivesse 100 DICT₅₀ determinadas de acordo com o método de REED & MUENCH¹⁶.

A 0,3 ml de suspensão, assim titulada, era adicionado igual volume de sôro padrão (*), previamente inativado. Deixados em contato durante 30 minutos à temperatura ambiente, 0,1 ml dessa mistura era inoculado em cada um de quatro tubos de cultura de células HEp-2. Essas culturas eram então incubadas a 36°C juntamente com outras culturas controle de vírus, de sôro e de células. Todas eram examinadas diariamente até que 50% a 75% das células das culturas controle de vírus apresentassem efeito citopático.

Reações sorológicas de neutralização — Para determinar o teor de anticorpos neutralizantes em soros de pacientes, foi empregada a técnica descrita acima. Foram usados os vírus tipados, isolados desses mesmos pacientes, e os soros correspondentes em diluições seriadas a partir de 1/8.

Sensibilidade a solvente orgânico — Foi usado o método de FELDMAN & WANG⁷. A 1 ml de suspensão de vírus foram acrescentados 0,05 ml de clorofórmio. Depois de 10 minutos o clorofórmio era separado e era inoculado 0,1 ml da porção aquosa em cada um de quatro tubos de culturas celulares para observação de eventual efeito citopático.

RESULTADOS

Foram feitas tentativas de isolamento de vírus a partir do material orofaríngeo colhido das 258 crianças observadas.

Porém, o alto grau de contaminação, principalmente causada por fungos, não permitiu que todas essas tentativas pudessem ser adequadamente observadas. Assim só puderam ser considerados neste estudo, os resultados provenientes de 165 dos casos mencionados, dos quais 62 apresentavam quadro clínico de broncopneumonia, 35 de bronquiolite, 20 de broncopneumonia associada à bronquiolite, 1 de broncopneumonia associada à miocardite, 1 de bronquiolite associada à miocardite, 8 de pneumonia intersticial, 11 de bronquite aguda, 4 de bronquite asmátiforme, 2 de atelectasia pulmonar, 1 de laringotraqueobronquite e 20 de infecções do tracto respiratório superior.

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Foram ao todo, isoladas 23 amostras de diversos vírus, originadas de 22 casos de infecções respiratórias.

Dessas 23 amostras, 9 eram de adenovírus (5,4%), 7 de vírus de herpes simples (4,2%), 4 de vírus respiratório sincicial (2,4%) e 3 de poliovírus (1,8%). Estas percentagens foram calculadas sobre o total de 165 casos considerados. Do mesmo material proveniente de um único caso, foram isolados dois vírus diferentes: vírus respiratório sincicial e vírus de herpes simples.

Dos nove adenovírus isolados, três eram do tipo 1, dois do tipo 2 e quatro do tipo 5.

Os adenovírus do tipo 1 foram isolados de dois casos de bronquite aguda e de um caso de bronquiolite associada à bronco-

(*) Sôro padrão do "Central Public Health Laboratory" da Inglaterra gentilmente cedido pela Dra. M. S. Pereira

pneumonia; os adenovírus do tipo 2, de dois casos de broncopneumonia e os adenovírus do tipo 5, de dois casos de infecção do tracto respiratório superior, de um caso de bronquiolite e de um caso de bronquiolite associada à broncopneumonia.

Das nove amostras de adenovírus isoladas, oito foram de crianças com idade variável de 5 a 12 meses, e, somente uma de uma criança com 1 ano e 5 meses (Tabela II).

As quatro amostras de adenovírus tipo 5 foram isoladas no mês de novembro de 1964, e as outras cinco amostras, no transcurso dos três anos em que se realizou o presente estudo, nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro, abril e agosto.

As reações de fixação do complemento, realizadas em 138 soros, colhidos de 69 doentes, em duas ocasiões sucessivas, mostraram aumento significativo do título de anticorpos, de pelo menos quatro vezes na segunda amostra de sôro, em quatro casos (5,7%).

O aumento de nível de anticorpos fixadores do complemento foi observado em soros

colhidos de dois pacientes com bronquiolite, de um doente com broncopneumonia, e de um paciente com bronquite (Tabela III). Dêsse último caso, foi isolado adenovírus tipo 1. De outro doente com bronquite do qual foi isolado, também, adenovírus tipo 1, e, do qual foi possível obter uma segunda amostra de sôro, não houve aumento do teor de anticorpos fixadores de complemento. Em ambos os casos, no entanto, houve aumento significativo do nível de anticorpos neutralizantes para os vírus correspondentes.

As quatro crianças que apresentaram elevação significativa do título de anticorpos fixadores de complemento tinham idades que variavam entre 5 e 12 meses (Tabela IV).

Êsses aumentos foram verificados em pacientes observados durante os meses de novembro, janeiro, abril e maio.

As reações de fixação de complemento realizadas em 158 amostras de soros obtidas na fase aguda da doença mostraram que 68 crianças, ao serem atendidas, já apresentavam anticorpos fixadores do complemento na diluição de pelo menos 1/8, variando a proporção de casos positivos conforme o grupo etário considerado (Tabela IV).

TABELA I

Isolamento de vírus de crianças de diversos grupos etários

Idade (meses)	N.º de casos estudados	N.º de vírus isolados	Vírus isolados
0-1	66	0	—
2-3	12	2	VRS(2)
4-5	19	5	Ad(2), Po(2), VRS(1)
6-11	26	8	Ad(4), Po(1), HS(3)
12-24	42	8	Ad(3), HS(3), VRS+HS(1)*
Total	165	23	Ad(9), Po(3) VRS(4), HS(7)

() — Algarismos entre parêntesis significam número de vírus isolados

Ad — Adenovírus

Po — Poliovírus

VRS — Virus respiratório sincicial

HS — Virus de herpes simples

* — Virus isolados do mesmo caso

TAKIMOTO, S.; ARAUJO, J. de; FISCHER, A. R.; MARTINEZ, C. H. O. & RIBEIRO DO VALLE, L. A. — Estudos sobre infecções causadas por vírus respiratórios em crianças de São Paulo. II — Adenovírus: isolamento e estudo sorológico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:348-357, 1969.

TABELA II

Isolamento de adenovírus de crianças de diversos grupos etários, apresentando diferentes quadros clínicos

Idade (meses)	N.º de casos estudados	Adenovirus isolados			
		N.º	%	Tipos	Quadros clínicos
0-1	66	0	—	Neg.	—
2-3	12	0	—	Neg.	—
4-5	19	2	10,5	Ad5(2)	ITRS(1); Bronquiolite(1) Bronquite(2)
6-11	26	4	15,3	Ad1(2) Ad2(1) Ad5(1)	Broncopneumonia(1) ITRS(1)
12-24	42	3	7,1	Ad1(1) Ad2(1) Ad5(1)	Broncopneumonia-bronquiolite(1) Broncopneumonia(1) Broncopneumonia-bronquiolite(1)
Total	165	9	5,4		

() — Algarismos entre parêntesis significam número de vírus isolados
 Ad — Adenovirus
 ITRS — Infecção do tracto respiratório superior
 Neg. — Negativo

TABELA III

Provas sorológicas de crianças apresentando aumento significativo de título de anticorpos

Identificação	Idade (meses)	Virus isolado	R.F.C.		R.N.		Quadro clínico
			1a A	2a A	1a A	2a A	
DMS	5	Neg.	<8	32	—	—	Bronquiolite
RFS	6	Ad1	16	16	<8	16	Bronquite
VRC	6	Ad1	<8	32	<8	32	Bronquite
MS	12	Neg.	16	64	—	—	Broncopneumonia
JDS	12	HS	<8	16	—	—	Bronquiolite

Ad — Adenovirus
 HS — Virus de herpes simples
 R.F.C. — Reação de fixação do complemento
 R.N. — Reação de neutralização
 A — Amostra de soro
 Neg. — Negativo
 — — Prova não realizada

TABELA IV

Resultados de reações de fixação do complemento para adenovírus realizadas em soros de doentes

Idade (meses)	N.º de casos	Casos com primeira amostra de soro positiva		N.º de casos com duas amostras de soro	Casos com aumento de anticorpos	
		N.º	%		N.º	%
0-1	60	30	50,0	28	0	—
2-3	18	0	—	10	0	—
4-5	19	0	—	6	1	16,6
6-11	25	8	32,0	15	1	6,6
12-24	36	30	83,3	10	2	20,0
Total	158	68	43,0	69	4	5,8

Isolamento de poliovírus — No transcorrer do estudo realizado foram isoladas de material orofaríngeo três amostras de poliovírus. De um doente com pneumonia intersticial foi isolado poliovírus I, de um paciente com bronquite, poliovírus II, e de um outro doente com infecção do tracto respiratório superior, poliovírus III. Do primeiro e do último paciente, foi possível obter uma segunda amostra de soro. Reações sorológicas de neutralização realizadas com esse material evidenciaram nítido aumento do teor de anticorpos para os poliovírus correspondentes.

DISCUSSÃO

A importância dos adenovírus como causa de infecções respiratórias em crianças é reconhecida por numerosos Autores^{6, 10, 13, 14, 19, 20, 23-25}.

Em nosso trabalho foram isolados adenovírus de casos de infecções do tracto respiratório superior (tipo 5), de bronquite (tipo 1), de broncopneumonia (tipo 2), de bronquiolite (tipos 1 e 5) e de broncopneumonia associada à bronquiolite (tipos 1 a 5). Também foram observados aumentos de ní-

vel de anticorpos fixadores do complemento para adenovírus em pacientes apresentando bronquite, broncopneumonia e bronquiolite.

Os tipos de vírus isolados (1, 2 e 5) correspondem àqueles previamente descritos como os que mais comumente podem causar infecções em crianças^{9, 10, 12, 13, 25}.

Foi pequeno o número de isolamento de vírus, nove adenovírus isolados de 165 casos (5,4%), e, poucos soros apresentaram aumento significativo de anticorpos fixadores do complemento, quatro em 69 pares de soros (5,7%).

De nenhuma das 89 crianças do grupo etário compreendido entre 0 e 4 meses foi isolado adenovírus. Também, as reações de fixação do complemento realizadas em soros obtidos de 44 crianças desse grupo etário não mostraram aumento significativo do teor de anticorpos correspondentes.

Excluindo-se essas crianças do total de casos estudados, a proporção de isolamento de adenovírus passa a ser de 11,8% e a de soros com aumento significativo de nível de anticorpos passa a ser de 16,0%, para crianças do grupo etário compreendido entre 5 e 24 meses (Tabelas V e VI).

TAKIMOTO, S.; ARAUJO, J. de; FISCHER, A. R.; MARTINEZ, C. H. O. & RIBEIRO DO VALLE, L. A. — Estudos sobre infecções causadas por vírus respiratórios em crianças de São Paulo. II — Adenovírus: isolamento e estudo sorológico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:348-357, 1969.

TABELA V

Isolamento de adenovírus de crianças doentes de acordo com a idade

Quadro clínico		N.º de adenovírus isolados	N.º de casos	%	N.º de crianças com 5 meses ou mais	%
ITRS	Total	2	20	10,0	11	18,1
ITRI	Broncopneumonia	(2)	(62)	(3,2)	(28)	(7,1)
	Bronquiolite	(1)	(35)	(2,8)	(8)	(12,5)
	Broncopneumonia e bronquiolite	(2)	(20)	(10,0)	(6)	(33,3)
	Bronquite	(2)	(11)	(18,1)	(10)	(20,0)
	Outras	(0)	(17)	(0,0)	(13)	(0,0)
	Total	7	145	4,8	65	10,7
Total geral		9	165	5,4	76	11,8

ITRS — Infecção do tracto respiratório superior

ITRI — Infecção do tracto respiratório inferior

TABELA VI

Aumento de títulos de anticorpos para adenovírus em crianças doentes de acordo com a idade

Quadro clínico		Aumento de anticorpos	N.º de casos	%	N.º de crianças com 5 meses ou mais	%
ITRS	Total	0	9	0,0	4	(0,0)
ITRI	Broncopneumonia	(1)	(28)	(3,5)	(9)	(11,1)
	Bronquiolite	(2)	(15)	(13,3)	(5)	(40,0)
	Bronquite	(1)	(3)	(33,3)	(3)	(33,3)
	Outras	(0)	(14)	(0,0)	(4)	(0,0)
	Total	4	60	6,7	21	19,0
	Total geral		4	69	5,8	25

ITRS — Infecção do tracto respiratório superior

ITRI — Infecção do tracto respiratório inferior

Ao mesmo tempo, cumpre assinalar que a maior incidência de infecções causadas por adenovírus, indicadas quer pelo isolamento de vírus quer pelo aumento de anticorpos, foi observada em crianças de 5 a 11 meses.

Grande proporção de crianças depois dessa idade apresentou anticorpos fixadores de complemento na primeira amostra de soro.

Esses resultados indicam que as crianças de mais de cinco meses se apresentam suscetíveis à infecção por adenovírus, enquanto que as crianças de menos de 4 meses parecem estar mais protegidas graças, provavelmente, à menor exposição à doença e a defesas recebidas do organismo materno. Por outro lado, a grande proporção de soros positivos em crianças do grupo etário compreendido entre 12 e 24 meses mostra que a incidência dessa infecção em nosso meio é muito grande, de acordo com outras observações. Levando em consideração a grande proporção de soros positivos no grupo etário compreendido entre 12 e 24 meses (83,3%), o pequeno número de isolamentos de vírus e de aumento de anticorpos observado neste trabalho, parece indicar que poucas crianças apresentando infecções causadas por esses vírus procuraram atendimento no Hospital das Clínicas da U.S.P., durante o período deste estudo.

Face ao número proporcionalmente elevado de isolamentos feitos em novembro de 1964, é muito provável que tenha ocorrido um surto de infecções naquela ocasião, causadas por adenovírus tipo 5, o que não é descrito com frequência.

Os isolamentos de vírus foram feitos predominantemente nos meses correspondentes às estações de primavera e verão.

SUMMARY

Studies on respiratory infections among children in São Paulo. II — Adenovirus isolations and serological studies

Between September 1964 and August 1967 attempts were made to isolate viruses from oropharyngeal specimens obtained from 258

children (0-2 years old) with acute respiratory infections attended by the General Hospital of the School of Medicine of the University of São Paulo, Brazil.

Out of 165 cases nine strains of adenovirus (5.4%) were isolated, being three of type 1, two of type 2 and four of type 5.

Serological tests carried out in 69 paired sera showed significant antibody rises for adenovirus in 4 cases (5.1%).

No strains of adenovirus were isolated nor any increase of complement fixing antibody titer for these viruses were observed in patients under 4 months old.

Four strains of adenovirus, all type 5, were isolated from cases occurring during one month (November, 1964), and the other five strains types 1 and 2, were isolated during the rest of the period of study.

The adenovirus strains were isolated from cases observed during Spring and Summer.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem a Dra. Marguerite Scott Pereira, do "Central Public Health Laboratory, Colindale", Londres, Inglaterra, D. Maria Elisa F. Vasconcellos, D. Maria Nydia de Castro, Dra. Elza Miyashiki, Sr. Manoel Conceição e Sr. Bienvenido Sáez Martin, da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, a colaboração prestada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. A report of the Medical Research Working Party on acute respiratory virus infections. A collaborative study of the aetiology of acute respiratory infections in Britain 1961-64. *Brit. Med. J.* 2:319-326, 1965.
2. BELL, J. A.; HUEBNER, J. R.; ROSEN, L.; ROWE, W. P.; COLE, R. M.; MATROTA, F. M.; FLOYD, T. M.; CHANOCK, R. M. & SHVEDOFF, R. A. — Illness and microbial experiences of nursery children at Junior Village. *Amer. J. Hyg.* 74:267-292, 1961.

3. BRUNO-LOBO, G.; PEREIRA, M. S. & PEREIRA, H. G. — Estudos sobre adenoviroses no Rio de Janeiro. *Anais Microbiol.* 9:567-578, 1961.
4. CARVALHO, R. P. de S. — *Contribuição para o estudo de adenovírus*. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1960.
5. CHANOCK, R. M.; CHAMBON, L.; CHANG, W.; GONÇALVES PEREIRA, F.; GHARPURE, P.; GRANT, L.; HATEN, J.; IMAN, L.; KALRA, S.; LIM, K.; MADALENGOITIA, J.; SPENCE, L.; TENG, P. & FERREIRA, W. — WHO respiratory disease survey in children. A serological study. *Bull. Org. Mond. Santé* 37:363-369, 1967.
6. CHANY, C.; LÉPINE, P.; LELONG, M.; LE-TAN-VINH; SATGÉ, P. & VIRAT, J. — Severe and fatal pneumonia in infants and young children associated with adenovirus infections. *Amer. J. Hyg.* 67:367-378, 1958.
7. FELDMAN, H. A. & WANG, S. S. — Sensitivity of various viruses to chloroform. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106:736-738, 1961.
8. HILLEMANN, M. R.; HAMPARIAN, V. V.; KETLER, A.; REILLY, C. M.; MCLELLAND, L.; CORNFIELD, D. & STOKES, J. — Acute respiratory illnesses among children and adults. Field study of contemporary importance of several viruses and appraisal of the literature. *J. Amer. Med. Ass.* 180:445-453, 1960.
9. HOLZEL, A.; PARKER, L.; PATTERSON, W. H.; CARTNEL, D.; WHITE, L. L. R.; PURDY, R.; THOMPSON, K. M. & TOBIN, J. O. H. — Virus isolations from diseases. Manchester, 1963-64. *Brit. Med. J.* 1:614-619, 1965.
10. HUEBNER, R. J.; ROWE, W. P.; WAND, T. G.; PARROTT, R. H. & BELL, J. A. — Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *New Eng. J. Med.* 251:1077-1086, 1954.
11. ARAUJO, J. de; TAKIMOTO, S.; FISCHER, A. R.; MARTINEZ, C. H. O. & RIBEIRO DO VALLE, L. A. — Estudos sobre infecções causadas por vírus respiratórios em crianças de São Paulo. I — Aspectos clínicos e epidemiológicos. (Em publicação).
12. MOFFET, H. I. & CRAMBLET, H. G. — Virus isolations and illnesses in young infants attending a Well Baby Clinic. *New Eng. J. Med.* 267:1213-1218, 1962.
13. PARROTT, R. H.; ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; BERNTON, H. W. & McCULLOUGH, N. M. — Outbreak of febrile pharyngitis and conjunctivitis associated with type 3 adenoidal-pharyngeal-conjunctival virus infections. *New Eng. J. Med.* 251:1087-1090, 1954.
14. PEREIRA, H. G. & KELLY, B. — Studies on natural and experimental infections by adenoviruses. *Proc. Roy. Soc. Med.* 50:755-757, 1957.
15. PEREIRA, M. S.; BRUNO-LOBO, G. & PEREIRA, H. G. — Inquérito sorológico sobre a incidência de certas viroses respiratórias no Rio de Janeiro. *Anais Microbiol.* 9:262-272, 1965.
16. REED, L. J. & MUENCH, H. A. — A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27:493-497, 1938.
17. RIBEIRO DO VALLE, L. A.; TAKIMOTO, S.; FISCHER, A. R.; MARTINEZ, C. H. O. & ARAUJO, J. de — Estudos sobre infecções causadas por vírus respiratórios em crianças de São Paulo. III — Vírus respiratório sincicial: isolamento e estudo sorológico. (Em publicação).
18. ROSE, H. M. — The adenoviruses. In *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases*. 3rd edition. New York, Amer. Publ. Health Ass., 1964.
19. ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K.; PARROTT, R. H. & WARD, T. G. — Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84:570-573, 1953.
20. STERNER, G. — Infections with adenovirus type 7 in children and their relationship to acute respiratory disease. *Acta Paediatrica* 48:287-298, 1959.
21. STOTT, R. J.; BELL, E. J.; EADIE, M. B.; ROSS, C. A. C. & GRIST, N. R. — A comparative virological study of children in hospital with respiratory and diarrhoeal illnesses. *J. Hyg.* 65:9-23, 1967.
22. URQUHART, G. E. D.; MOFFAT, M. A. J.; CALDER, M. A. & CRUICKSHANK, G. M. — An aetiological study of respiratory infection in children, Edinburg City Hospital, 1961-1963. *J. Hyg.* 63:187-199, 1965.
23. VAN DER VEEN, J. — The role of adenoviruses in respiratory disease. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 88:167-180, 1963.

TAKIMOTO, S.; ARAUJO, J. de; FISCHER, A. R.; MARTINEZ, C. H. O. & RIBEIRO DO VALLE, L. A. — Estudos sôbre infecções causadas por vírus respiratórios em crianças de São Paulo. II — Adenovirus: isolamento e estudo sorológico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:348-357, 1969.

24. VAN ZAANE, J. & VAN DER VEEN, J. — Quelques symptomes cliniques particuliers chez les enfants atteints d'une infection à adénovirus. *Presse Med.* 70:1021-1022, 1962.
25. VARGOSKO, A. J.; KIM, H. W.; PARROTT, R. H.; JEFFRIES, R. C.; WONG, D. & CHANOCK, R. M. — Recovery and identification of adenovirus in infection of infants and children. *Bact. Rev.* 29:487-495, 1965.
26. VERONESI, R.; CARVALHO, R. P. de S. & FAVA NETTO, C. — Viroses do aparelho respiratório. Comprovação da infecção pelos "vírus hemadsorventes" e adenovirus em diferentes grupos etários de São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo* 13:355-362, 1958.

Recebido para publicação em 31/3/1969.