

ANTICORPOS FIXADORES DE COMPLEMENTO PARA O VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL E ADENOVÍRUS E INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO PARA OS VÍRUS PARAINFLUENZA 1, 2 E 3 NUMA POPULAÇÃO INFANTIL BRASILEIRA ⁽¹⁾

José Alberto Neves CANDEIAS

Apresentaram-se os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, assim como de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3, num grupo de 972 crianças de idade compreendida entre 3 meses e 14 anos. A técnica de colheita de sangue foi a de embebição em papel de filtro. Do total de crianças examinadas, considerando o conjunto de todas as idades, 34,6% apresentavam anticorpos para o vírus respiratório sincicial; as porcentagens com anticorpos para adenovírus, parainfluenza 1, parainfluenza 2 e parainfluenza 3, foram respectivamente 47,7%, 46,8%, 54,1% e 66,6%. Foram estudadas as distribuições dos anticorpos em função da idade, do sexo e da localização do domicílio. Em relação aos dois últimos atributos obtiveram-se os seguintes resultados: dos indivíduos do sexo masculino, 32,3% apresentavam anticorpos contra o vírus respiratório sincicial, 49,2% contra adenovírus, 60,1%, 65,1% e 78,3%, respectivamente, contra os vírus parainfluenza 1, 2 e 3; nas crianças do sexo feminino as porcentagens de positividade encontradas foram, respectivamente, 37,4%, 45,9%, 31,1%, 41,2% e 52,9%; em relação à localização do domicílio, 44,8% do total de crianças da zona rural mostraram possuir anticorpos contra o vírus respiratório sincicial, 70,1% contra adenovírus, 43,8% contra vírus parainfluenza 1 e 46,8% e 65,4% contra os vírus parainfluenza dos tipos 2 e 3; as porcentagens de positividade na zona urbana foram, respectivamente, 30,5%, 38,7%, 47,9%, 57,1% e 67,1%.

INTRODUÇÃO

A Saúde Pública confronta-se com uma escala de problemas, cuja prioridade, no que diz respeito a uma possível solução, vai corresponder, sistematicamente, às condições sócio-econômicas locais. É esta a razão pela qual os problemas focalizados nos países desenvolvidos não são os mesmos das estruturas menos avançadas onde, de um modo geral, as doenças infecciosas constituem o centro da atenção dos especialistas. As doenças respirató-

rias agudas, entretanto, quer se apresentem sob a forma de casos esporádicos, epidemias localizadas ou pandemias, formam um denominador comum a ambas as estruturas.

Estão incluídas na designação de doenças respiratórias agudas a vírus, a influenza e todo um conjunto de outras infecções que ocasionam condições clínicas complexas e nas quais parecem ser particularmente importantes os seguintes

(1) Da Cadeira de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP. — Resumo da Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP, em 1968.

vírus: vírus parainfluenza 1-4 (KUROYA et alii⁵⁴; CHANOCK¹⁷, 1956; CHANOCK et alii¹⁸, 1958 e JOHNSON et alii⁴⁸, 1960), vírus respiratório sincicial (MORRIS, BLOUNT & SAVAGE⁶⁰, 1956; CHANOCK, ROIZMAN & MYERS¹⁶, 1957), adenovírus (ROWE et alii⁷¹, 1953), mais freqüentemente dos tipos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 e 21, vírus Coxsackie (DALLDORF & SICKLES²⁵, 1948) dos tipos A2-7, A9, A21, B1-5, vírus ECHO (COMMITTEE ON ECHO VIRUSES²³, 1956) dos tipos 6, 11 e 20, rinovírus (ANDREWES et alii², 1953) e vírus REO (STANLEY, DORMAN & PONSFORD⁷⁹, 1954).

Apesar de extenso, parece ser ainda insuficiente o número de pesquisas feitas no sentido de elucidar a participação de todos os vírus referidos naquela multiplicidade de condições clínicas, muito embora se suspeite que, de um modo geral, os rinovírus parecem ser importantes no resfriado comum, os vírus parainfluenza na laringotraqueobronquite aguda, o vírus respiratório sincicial na bronquiolite aguda e os adenovírus na pneumonite viral.

É nosso objetivo conhecer a distribuição, segundo determinados atributos, dos anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e para adenovírus e dos anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3, num grupo de crianças de 0 a 14 anos. De posse desta informação, poderemos ter uma idéia da freqüência e distribuição das infecções respiratórias ocasionadas por estes vírus como ponto de partida para uma pesquisa ulterior, mais ampla, que visa conhecer seu comportamento e sua importância, em ambiente familiar, não só através de estudos sorológicos, mas também de isolamento dos agentes etiológicos referidos.

MATERIAL E METODOS

Amostragem — Foram colhidos 972 espécimens de sangue de crianças, sem qualquer quadro clínico respiratório ou

entérico, inscritas no Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) e que recorreram a seus serviços médico-assistenciais entre 7 de dezembro de 1966 e 18 de abril de 1967. Dêste total, 526 espécimens provinham de crianças do sexo masculino e 446, do sexo feminino. No que respeita à localização do domicílio, 694 espécimens correspondiam a crianças da zona urbana e 278 a crianças da zona rural, dentro do critério de classificação em zona urbana e rural adotado pelo SESA. Estabelece êste ser necessário que existam serviços públicos municipais para que determinada comunidade seja considerada como pertencendo à zona urbana. O critério adotado não considera a existência de zona suburbana.

Foi feita uma só colheita de sangue das crianças atendidas, com idade compreendida entre 0 a 14 anos, de tal modo que, em cada mês, houvesse uma distribuição etária sensivelmente semelhante e, ao mesmo tempo, um número, aproximadamente, igual de indivíduos em cada grupo.

O método de amostragem circunstancial utilizado não é o mais satisfatório, mas achamos que o material obtido se presta à pesquisa a que nos propusemos, tendo em vista que não pretendemos tirar, dos resultados obtidos, conclusões aplicáveis à população infantil do município de Araraquara, mas, tão somente, analisá-los em relação ao total de crianças inscritas no SESA.

Apesar de nos empenharmos em estabelecer a presença de circunstâncias anormais que pudessem determinar grandes diferenças de probabilidade, de uma criança para outra, de pertencer à amostra estudada, aquelas não pareceram ter estado presentes entre 7 de dezembro de 1966 a 18 de abril de 1967. Acreditamos que as crianças que fazem parte do grupo estudado tiveram, aproximadamente, a mesma probabilidade de pertencer à amostra, do que crianças não incluídas naquele grupo.

Tivemos, assim, a oportunidade de determinar o tamanho da amostra a estudar, em cada grupo etário, seguindo as mesmas regras aplicadas à amostragem equi-probabilística. Desconhecendo nós qual a proporção de distribuição dos títulos de anticorpos para os vírus estudados, para cada domínio, consideramos que a mesma deveria obedecer à pior das distribuições, isto é, àquela que admite 50% de positivos ($P = 0,5$) e 50% de negativos ($Q = 0,5$).

Estabelecendo ainda que admitiríamos um erro de amostragem de, no máximo, 5% ($d = 0,05$) e que aceitaríamos uma probabilidade de 5% de selecionarmos uma amostra cujo erro de amostragem ultrapasse "d" em valor absoluto, criamos limitações que levaram ao cálculo dos valores que deveriam ter os tamanhos das amostras, a fim de alcançarmos a precisão desejada. São êstes: 317 para a classe de crianças de idade inferior a 1 ano, 341 para a classe de crianças de idade compreendida entre 1 e 6 anos e de 330 para a classe de crianças de idade compreendida entre 7 e 14 anos. Realmente, o tamanho das amostras estudadas é o que figura na Tabela 1, onde também pode ver-se o número de crianças inscritas no SESA, no período durante o qual foi feita a colheita de sangue.

O tamanho das amostras para as classes de 1 a 6 anos e 7 a 14 anos ultrapassa o requerido. Com relação à classe de idade inferior a 1 ano, embora o tamanho calculado tivesse sido de 317 crianças, não houve possibilidade de obter uma amostra com tal grandeza, de forma que teremos de aceitar uma margem de erro de 9%, em substituição àquela de 5%. Devemos ainda chamar a atenção para o fato de, nesta classe, não se encontrar nenhuma criança de 1 e 2 meses de idade, o que ocorreu pela circunstância de, durante o período de colheita, não terem aparecido na consulta médica crianças com aquela idade. Assim sendo, quando nos referimos à classe de crianças de idade inferior a 1 ano, significamos o conjunto de crianças com idade compreendida entre 3 meses e 11 meses.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 apresentamos as distribuições mensais das crianças de 1 a 14 anos examinadas, segundo a idade, sexo e localização do domicílio.

A fim de verificarmos se a estrutura mensal, em termos de idade, sexo e localização do domicílio, era semelhante, durante o período da colheita, foi feito para cada tabela, um teste de significância de diferenças de proporção (GOLD³⁷, 1962) ao nível de 5%. Os resultados obtidos revelam que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas.

TABELA 1

Distribuição das crianças estudadas e das crianças inscritas no SESA, no período
7 de dezembro de 1966 — 18 de abril de 1967, segundo a idade

Idade em anos	Crianças inscritas		Crianças estudadas	
	N.º	%	N.º	%
< 1	1.814	23,9	126	12,9
1 — 6	3.404	44,9	461	47,4
7 — 14	2.347	31,2	385	39,7
Total	7.565	100,0	972	100,0

TABELA 2

Distribuição mensal das crianças de 1 a 14 anos, inscritas no SESA e examinadas no período 7 de dezembro de 1966 — 18 de abril de 1967, segundo a idade

Idade (em anos)	Número de crianças examinadas	Mês							
		Dezembro		Jan./Fev.		Março		Abril	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
1 — 6	461	146	56,2	139	55,6	73	54,9	103	50,7
7 — 14	385	114	43,8	111	44,4	60	45,1	100	49,3
Total	846	260	100,0	250	100,0	133	100,0	203	100,0

TABELA 3

Distribuição mensal das crianças de 1 a 14 anos, inscritos no SESA e examinadas no período 7 de dezembro de 1966 — 18 de abril de 1967, segundo o sexo

Sexo	Número de crianças examinadas	Mês							
		Dezembro		Jan./Fev.		Março		Abril	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Masculino	458	134	51,6	142	56,8	69	51,8	113	53,6
Feminino	388	126	48,4	108	43,2	64	48,2	90	44,4
Total	846	260	100,0	250	100,0	133	100,0	203	100,0

TABELA 4

Distribuição mensal das crianças de 1 a 14 anos, inscritas no SESA e examinadas no período 7 de dezembro de 1966 — 18 de abril de 1967, segundo a localização do domicílio

Localização do domicílio	Número de crianças examinadas	Mês							
		Dezembro		Jan./Fev.		Março		Abril	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Urbana	595	183	70,4	170	68,0	101	75,9	141	69,5
Rural	251	77	29,6	80	32,0	32	24,1	62	30,5
Total	846	260	100,0	250	100,0	133	100,0	203	100,0

Colheita dos espécimens de sangue — Estes foram colhidos da polpa do dedo indicador, por picada com agulha esterilizada, tendo sido utilizada uma agulha para cada criança. Depois de feita a limpeza do dedo com álcool e após secagem completa, foi feito o lancetamento; o sangue obtido, por expressão, foi colhido numa tira de papel filtro⁽¹⁾, do tipo usado para eletroforese, não tendo sido difícil distribuir o sangue de modo a obterem-se, no mínimo, três manchas por criança. Os espécimens de sangue colhidos segundo esta técnica, após secagem à temperatura ambiente, foram agrupados em pequenos livretos, cada um dos quais correspondia ao material obtido de 20 crianças e remetidos, dentro de uma semana, à Faculdade de Higiene e Saúde Pública de São Paulo, através da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, tendo sido, uma vez recebidos, conservados a 4°C, até ulterior exame. O total de espécimens obtidos foi conservado nestas condições entre 4 e 6 meses.

Preparação dos extratos — Para a extração do sangue do papel de filtro, por eluição, recortou-se cada mancha de modo a ocupar uma superfície de 4 cm² e mergulhou-se este fragmento em 0,25 ml de uma solução salina tamponada (NaCl 0,15 M; fosfato 0,01 M; pH = 7,2), em tubos de ensaio 12 × 75, mantendo-se na geladeira a 4°C, de um dia para outro. No dia seguinte retirou-se o papel de filtro, obtendo-se um extrato que se considerava como correspondendo a uma diluição de sôro de 1:8, uma vez que cada 4 cm² de papel de filtro, do tipo usado, absorve cerca de 0,08 ml de sangue⁽²⁾. Este material foi utilizado para as reações de fixação de complemento, destinadas a evidenciar anticorpos para o vírus respiratório sincicial e para adenovírus.

O material utilizado nas reações de inibição da hemaglutinação, destinadas à

pesquisa de anticorpos para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3, obteve-se seguindo a técnica anterior com uma ligeira modificação, para eliminar os inibidores inespecíficos da hemaglutinação: a eluição foi feita em 0,25 ml de uma suspensão de caolin a 25%, em salina tamponada (NaCl 0,15 M; fosfato 0,01 M; pH = 7,2), de um dia para outro, a 4°C, depois do que se retirou o papel de filtro e se removeu o caolin por centrifugação a 2.500 RPM, durante 20 minutos. O sobrenadante considerava-se como correspondendo a uma diluição de sôro de 1:8. Em virtude da diluição inicial ser, obrigatoriamente, mais elevada, situação que não nos interessava explorar, não utilizamos o RDE para a remoção de inibidores inespecíficos. O tratamento pelo caolin, em certos casos tem tendência a remover, também, anticorpos específicos (SCHMIDT, LENNETTE & KING⁷⁴, 1966), no entanto, consideramos esta técnica de maior utilidade, em nosso estudo, apesar daquele inconveniente.

Reação de fixação do complemento — A técnica utilizada segue as normas estabelecidas por BRADSTREET & TAYLOR⁶ (1962), com algumas modificações: o volume final da reação, de 0,5 ml, foi completado pela mistura de 0,1 ml de cada diluição do sôro a examinar, 0,1 ml da dose ótima de antígeno, 0,1 ml da diluição do complemento contendo 2 unidades C'H₁₀₀ e 0,2 ml de uma suspensão a 2% de hemácias de carneiro sensibilizadas.

Na reação foi usada a solução salina tamponada já descrita anteriormente, a propósito da obtenção dos extratos que, como dissemos, considerávamos equivalentes a uma diluição de sôro a 1:8. Os extratos foram inativados a 56°C durante 30 minutos e centrifugados a 2.500 RPM durante 15 minutos, com o que se obteve um sobrenadante líquido, utilizado no preparo de diluições consecutivas,

(1) CARL SCHLEICHER & SCHÖL Co. n.º 2043.

(2) CANDEIAS, J. A. N. — Dados inéditos.

com fator 2, na própria placa de aglutinação do tipo padronizado pela OMS.

A dose ótima de antígeno foi encontrada por "titulação em bloco", contra o respectivo sôro padrão, sendo definida como a dose capaz de revelar a menor quantidade de anticorpos.

A diluição do complemento com 2 unidades $C'H_{100}$ foi encontrada por "titulação em bloco" frente ao sôro hemolítico. Com esta titulação obteve-se, também, a dose ótima de hemolisina que consideramos como a dose capaz de ocasionar maior lise com a mais alta diluição do complemento. Uma unidade $C'H_{100}$ de complemento é a diluição que dá 100% de hemólise frente à dose ótima de hemolisina.

O complemento utilizado na reação foi preservado pelo método de RICHARDSON⁷⁰ (1941). Quando conservado a 4°C pode manter-se aproximadamente por 1 ano (BRADSTREET & TAYLOR⁶, 1962), mas em nossas reações sua preparação foi feita mensalmente. Como o complemento preservado por aquêl método é hipertônico, a diluição teve de ser feita com salina e água destilada, nas seguintes proporções: para cada 0,1 ml de complemento utilizavam-se 0,7 ml de água destilada e um volume V de salina que variava conforme a diluição desejada. Êste volume pode obter-se da fórmula

$$V = \frac{(dc' - 10)8}{100},$$

em que dc' é a recíproca da diluição do complemento desejada.

A suspensão de hemácias de carneiro a 2% foi sensibilizada com a dose ótima de hemolisina, em partes iguais.

Foram incluídos na reação os controles de sôro, de antígenos, de hemácias e de complemento, êste último preparado com diluições contendo $2C'H_{100}$, $1C'H_{100}$ e $\frac{1}{2}C'H_{100}$.

Reação de inibição da hemaglutinação

— Esta reação foi executada seguindo o

método de SEVER⁷⁵ (1962), com algumas modificações (APHA¹, 1964), utilizando-se o conjunto microtitulador de Takatsy (TAKATSY⁸⁰).

A solução salina tamponada, já referida, foi o diluente utilizado na reação.

Com o extrato de cada um dos espécimens de sangue foram feitas diluições seriadas, com fator 2, e a cada uma delas foram adicionados 0,025 ml de cada um dos antígenos, parainfluenza 1, 2 e 3, tendo êstes sido diluídos de modo a conter, naquele volume, 4 unidades hemaglutinantes. As misturas sôro-vírus foram incubadas, à temperatura ambiente, durante 60 minutos, depois do que se adicionaram, a cada uma, 0,025 ml de uma suspensão a 0,8% de hemácias humanas do grupo O. A leitura dos resultados foi feita após manutenção das referidas misturas à temperatura ambiente, durante 90 minutos.

Foram incluídos na reação os controles de sôro, de hemácias e de vírus, êste último com a finalidade de poder confirmar-se que estavam sendo usadas, na reação, 4 unidades hemaglutinantes.

Amostras padrões do vírus e soros — As amostras padrões de vírus respiratório sincicial, adenovírus e vírus parainfluenza tipos 1, 2 e 3, bem como de soros específicos foram fornecidas pela Dra. M. S. Pereira, de "Virus Reference Laboratory — Central Public Health Laboratories, Colindale", Londres. A amostra padrão de vírus respiratório sincicial utilizada foi a cêpa Long, com passagens múltiplas em células HeLa, nas quais ocasiona um efeito citopático típico, que se estende a cêrca de 75% da camada celular, em culturas de células preparadas em tubos 16 × 150, ao fim de 5 dias. A amostra padrão de adenovírus utilizada foi a cêpa padrão do tipo 5 — Sub. 5 U.S.A. — com passagens múltiplas em cultura de células HeLa, nas quais ocasiona um efeito citopático típico, que se estende a cêrca de 75% da camada celular, em culturas de células

preparadas em tubos 16 × 150, ao fim de 3-4 dias. A amostra padrão de vírus parainfluenza 1 utilizada, foi uma cêpa com 6 passagens em culturas de rim de macaco rhesus e 4 passagens em culturas de rim embrionário humano; a amostra padrão de vírus parainfluenza 3 utilizada foi uma cêpa com 4 passagens em cultura de rim embrionário humano.

Preparação dos antígenos — O antígeno de vírus respiratório sincicial, destinado à reação de fixação do complemento, foi obtido em culturas de células HeLa, preparadas em tubos 16 × 150, usando-se como meio de crescimento um meio com 20% de sêro inativado de vitela, 0,5% de hidrolisado de lactalbumina e 79,5% de solução salina de Hanks, adicionado de penicilina e estreptomocina na concentração final de 200 unidades por ml. Antes de inoculados os tubos de cultura com a amostra de vírus padrão, as culturas eram lavadas com solução salina de Hanks, contendo penicilina e estreptomocina na concentração final de 200 unidades por ml. Cada tubo era então inoculado com 0,2 ml da amostra padrão de vírus e 0,8 ml de meio de manutenção constituído por 0,5% de hidrolisado de lactalbumina e 99,5% de solução salina de Hanks, com penicilina e estreptomocina na concentração final de 200 unidades por ml. As culturas infectadas eram incubadas a 37°C até o momento em que se notava um efeito citopático mais acentuado, quando se congelavam e descongelavam, por três vêzes, constituindo o líquido de cultura com restos celulares, o antígeno utilizado, após inativação a 56°C, durante 30 minutos.

Para a obtenção do antígeno de adenovírus utilizado na reação de fixação de complemento prepararam-se culturas de células HeLa, usando o meio de crescimento referido acima. Cada tubo era inoculado com 0,2 ml da amostra padrão de adenovírus tipo 5 e 0,8 ml do já

mencionado meio de manutenção. As culturas infectadas eram incubadas a 37°C até aparecimento de efeito citopático máximo. O líquido de cultura com restos celulares constituía o antígeno, após inativação a 56°C durante 30 minutos, sem se recorrer ao congelamento e descongelamento múltiplo.

Os antígenos de vírus parainfluenza 1, 2 e 3, utilizados na reação de inibição da hemaglutinação foram preparados em culturas primárias de rim de macaco rhesus. Estas culturas são recebidas em meio de manutenção Melnick A, com sêro anti-SV₅ na concentração de 0,2%.⁽¹⁾ Antes de inoculadas, eram lavadas com solução salina de Hanks, contendo penicilina e estreptomocina na concentração final de 200 unidades por ml. Cada tubo de cultura era inoculado com 0,2 ml da amostra padrão de vírus e 0,8 ml de meio 199, com penicilina e estreptomocina na concentração final de 200 unidades por ml. As culturas infectadas eram incubadas a 33°C até o efeito citopático máximo. A titulação por hemadsorção com uma suspensão de hemácias de coaba a 0,4%, após incubação durante 20 minutos a 4°C, deu, regularmente, títulos maiores que 10⁶ TCD₅₀ para os vírus parainfluenza 1 e 2 e da ordem de 10^{5,5} TCD₅₀, para o vírus parainfluenza 3. As culturas congeladas e descongeladas por três vêzes, constituíam o antígeno utilizado na reação.

RESULTADOS

A distribuição dos soros positivos para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, em função da idade, nas 972 crianças examinadas, é apresentada na Tabela 5. Obtiveram-se porcentagens de positividade de 21,5%, 19,6%, 30,3% e 44,4% correspondentes, respectivamente, aos grupos etários de 3 a 6 meses, 7 a 11 meses, 1 a 6 anos e 7 a 14 anos, no

(1) Flow Laboratories Inc., U.S.A.

caso do vírus respiratório sincicial; para os adenovírus, semelhante distribuição apresenta os valores 24,6%, 22,9%, 53,5% e 48,5%. Englobando tôdas as idades, daquele total, 337 soros foram positivos para o vírus respiratório sincicial (34,6%) e 464 soros mostraram-se positivos para adenovírus (47,7%).

Na Tabela 6 apresentamos a distribuição porcentual das crianças estudadas, conforme os títulos de anticorpos fixadores de complemento e por grupo etário.

No grupo de idade inferior a 1 ano, de um total de 26 soros positivos para o vírus respiratório sincicial, 88,5% distribuem-se na faixa de títulos 8 e 16 e os 11,5% restantes pelos títulos iguais ou superiores a 32; já no grupo de 1 a 14 anos estas porcentagens foram, respectivamente, de 79,7% e 20,3%, num total de 311 soros positivos. Dos 30 soros positivos para adenovírus, no grupo de idade inferior a 1 ano, 83,4% possuíam títulos de 8 e 16 e 16,6% títulos iguais ou superiores a 32; nas 434 crianças

TABELA 5

Distribuição dos soros positivos para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, segundo a idade, em 972 crianças examinadas

Grupo etário	Número de soros examinados	Soros Positivos (1)			
		Vírus respiratório sincicial		Adenovírus	
		N.º	%	N.º	%
3 — 6 meses	65	14	21,5	16	24,6
7 — 11 meses	61	12	19,6	14	22,9
1 — 6 anos	461	140	30,3	247	53,5
7 — 14 anos	385	171	44,4	187	48,5
Total	972	337	34,6	464	47,7

(1) Soros de título \geq 8.

TABELA 6

Distribuição porcentual das crianças estudadas, segundo o título de anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e adenovírus e segundo o grupo etário

Grupo etário (anos)	Título	Vírus respiratório sincicial	Adenovírus
< 1	8 — 16	88,5%	83,4%
	\geq 32	11,5%	16,6%
		100,0%	100,0%
Total		(26)	(30)
1 — 14	8 — 16	79,7%	83,6%
	\geq 32	20,3%	16,4%
		100,0%	100,0%
Total		(311)	(434)

de idade compreendida entre 1 e 14 anos, com soros positivos para adenovírus, a distribuição é muito semelhante, com porcentagens de 83,6% e 16,4%.

Na Tabela 7 apresentamos as diferentes porcentagens de positividade para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, para um e outro sexo, em crianças menores de 1 ano e de idade superior a 1 ano. Pode observar-se que os indivíduos de sexo feminino apresentam porcentagens mais elevadas do que os de sexo masculino, da ordem de 22,4% contra 19,1% e 24,1% contra 23,5%, nas crianças de idade inferior a 1 ano. No grupo de crianças de 1 a 14 anos evidencia-se uma discreta predominância do

sexo feminino em relação ao masculino para o primeiro vírus referido, como indicam as porcentagens de 39,6% e 34,2%, enquanto para os adenovírus este predomínio se define no sexo masculino com a porcentagem de 53,2% contra 49,2%.

Um estudo comparativo entre a localização do domicílio e as porcentagens de soros positivos para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, leva aos resultados apresentados na Tabela 8, onde as porcentagens de positividade para ambos os vírus são maiores na zona rural do que na zona urbana, em qualquer dos grupos etários, com valores de 22,2% e 20,2%, em relação ao vírus respiratório sinci-

TABELA 7

Distribuição dos soros positivos para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, segundo o sexo, em 972 crianças examinadas

Grupo etário (anos)	Sexo	Número de soros examinados	Soros Positivos (1)			
			Vírus respiratório sincicial		Adenovírus	
			N.º	%	N.º	%
< 1	Masc.	68	13	19,1	16	23,5
	Fem.	58	13	22,4	14	24,1
1 — 14	Masc.	458	157	34,2	243	53,2
	Fem.	388	154	39,6	191	49,2
Total		972	337	34,6	464	47,7

(1) Soros de título \geq 8.

TABELA 8

Distribuição dos soros positivos para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, segundo a localização do domicílio, em 972 crianças examinadas

Grupo etário (anos)	Localização do domicílio	Número de soros examinados	Soros Positivos (1)			
			Vírus respiratório sincicial		Adenovírus	
			N.º	%	N.º	%
< 1	Urbana	99	20	20,2	23	23,2
	Rural	27	6	22,2	7	25,9
1 — 14	Urbana	595	192	32,2	246	41,3
	Rural	251	119	47,4	188	74,9
Total		972	337	34,6	464	47,7

(1) Soros de título \geq 8.

cial e 25,9% e 23,2% para os adenovírus, em crianças de idade inferior a 1 ano; nas crianças cuja idade variava entre 1 e 14 anos, aquelas porcentagens foram, respectivamente, 47,4% e 32,2% e 74,9% e 41,3%.

A distribuição dos soros positivos para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3, segundo a idade, é apresentada na Tabela 9. Obtiveram-se porcentagens de positividade de 46,1%, 32,7%, 41,8%, 55,1% para os grupos etários de 3 a 6 meses, 7 a 11 meses, 1 a 6 anos e 7 a 14 anos, no caso do vírus parainfluenza

do tipo 1; para o tipo 2, estas porcentagens foram respectivamente de 44,6%, 40,9%, 48,3% e 64,6%; em relação ao tipo 3, obtiveram-se as seguintes porcentagens distribuídas pelos grupos etários referidos: 53,8%, 37,7%, 59,8% e 81,5%. Considerando o conjunto de todas as idades, do total de 972 crianças examinadas, 455 mostraram-se positivas para o vírus parainfluenza 1 (46,8%), 526 para o parainfluenza 2 (54,1%) e 648 para o parainfluenza 3 (66,6%).

Na Tabela 10 podem comparar-se as porcentagens de positividade, conforme

TABELA 9

Distribuição dos soros positivos para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3, segundo a idade, em 972 crianças examinadas

Grupo etário	Número de soros examinados	Soros Positivos (1)					
		Parainfluenza 1		Parainfluenza 2		Parainfluenza 3	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
3 — 6 meses	65	30	46,1	29	44,6	35	53,8
7 — 11 meses	61	20	32,7	25	40,9	23	37,7
1 — 6 anos	461	193	41,8	223	48,3	276	59,8
7 — 14 anos	385	212	55,1	249	64,6	314	81,5
Total	972	455	46,8	526	54,1	648	66,6

(1) Soros de título \geq 16.

TABELA 10

Distribuição porcentual das crianças estudadas, segundo o título de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3 e segundo o grupo etário

Grupo etário (anos)	Título	V í r u s		
		Parainfluenza 1	Parainfluenza 2	Parainfluenza 3
< 1	16 — 32	64,0%	48,1%	31,1%
	64 — 128	34,0%	46,3%	51,7%
	256	2,0%	5,6%	17,2%
Total		100,0%	100,0%	100,0%
		(50)	(54)	(58)
1 — 14	16 — 32	87,4%	57,2%	28,3%
	64 — 128	10,1%	39,4%	61,4%
	256	2,5%	3,4%	10,3%
Total		100,0%	100,0%	100,0%
		(405)	(472)	(590)

os títulos inibidores da hemaglutinação, por grupo etário. No grupo etário de menores de 1 ano, as porcentagens de positividade para o vírus parainfluenza 1 tomam os valores 64,0% nos títulos 16 a 32, 34,0%, nos títulos 64 a 128 e somente 2,0% com título de 256. Para os vírus dos tipos 2 e 3 as respectivas porcentagens são, 48,1% e 31,1%; 46,3% e 51,7%; 5,6% e 17,2%. Analisando o que se passa no grupo etário de 1 a 14 anos, para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3 e em relação às faixas de títulos referidas, as porcentagens obtidas são:

87,4%, 10,1% e 2,5%; 57,2%, 39,4% e 3,4%; 28,3%, 61,4% e 10,3%.

Na Tabela 11 pode ver-se que, tanto em relação ao grupo de crianças de idade inferior a 1 ano, como ao grupo de 1 a 14 anos, as porcentagens de positividade são mais acentuadas nos indivíduos de sexo masculino, com valores de 51,4% para o vírus parainfluenza 1, 50,0% para o vírus parainfluenza 2 e 51,4% para o vírus parainfluenza 3, contra 25,8%, 34,4% e 39,6% nas crianças do sexo feminino, no primeiro grupo etário. No grupo de 1 a 14 anos aquê-

TABELA 11

Distribuição dos soros positivos para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3, segundo o sexo, em 972 crianças examinadas

Idade (em anos)	Sexo	Número de soros examinados	Soros Positivos (1)					
			Parainfluenza 1		Parainfluenza 2		Parainfluenza 3	
			N.º	%	N.º	%	N.º	%
< 1	Masc.	68	35	51,4	34	50,0	35	51,4
	Fem.	58	15	25,8	20	34,4	23	39,6
1 — 14	Masc.	458	281	61,3	308	67,2	377	82,3
	Fem.	388	124	31,9	164	42,2	213	54,8
Total		972	455	46,8	526	54,1	648	66,6

(1) Soros de título \geq 16.

TABELA 12

Distribuição dos soros positivos para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3, segundo a localização do domicílio, em 972 crianças examinadas

Idade (em anos)	Localização do domicílio	Número de soros examinados	Soros Positivos (1)					
			Parainfluenza 1		Parainfluenza 2		Parainfluenza 3	
			N.º	%	N.º	%	N.º	%
< 1	Urbana	99	40	40,4	45	45,4	47	47,4
	Rural	27	10	37,1	9	33,3	11	40,7
1 — 14	Urbana	595	293	49,2	351	58,9	419	70,4
	Rural	251	112	44,6	121	48,2	171	68,1
Total		972	455	46,8	526	54,1	648	66,6

(1) Soros de título \geq 16.

les valores percentuais foram, respectivamente, 61,3% e 31,9% para o vírus parainfluenza 1, 67,2% e 42,2% para o vírus parainfluenza 2 e 82,3% e 54,8% para o vírus parainfluenza 3.

Analisando na Tabela 12 a distribuição das porcentagens de soros positivos para o vírus parainfluenza 1, 2 e 3, nas zonas urbana e rural, pode observar-se uma aparente predominância da zona urbana sobre a zona rural, por força dos seguintes valores: no grupo etário de idade inferior a 1 ano, 40,4% e 37,1% para o vírus parainfluenza 1, 45,4% e 33,3% para o vírus parainfluenza 2, 47,4% e 40,7% para o vírus parainfluenza 3. No grupo etário de 1 a 14 anos, 49,2% e 44,6% para o vírus parainfluenza 1, 58,9% e 48,2% para o vírus parainfluenza 2 e, finalmente, 70,4% e 68,1% para o vírus parainfluenza 3.

DISCUSSÃO

O emprêgo da reação de inibição da hemaglutinação, feita segundo técnica que utiliza quantidades mínimas de soro, da ordem de 0,025 ml, e da reação de fixação do complemento feita em placas de aglutinação, permitiu-nos estudar a distribuição de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3 e de anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e adenovírus, num extenso número de crianças. Estudos feitos por outros autores demonstraram a utilidade destas técnicas (BEEM et alii³, 1960; BRUNO-LÔBO, PEREIRA & PEREIRA⁹, 1961; SEVER⁷⁵, 1962; HSIUNG, ISACSON & TUCKER⁴³, 1963; HORNSLETH & VOLKERT⁴², 1964; CANDEIAS & CHRISTOVÃO¹¹, 1966; GWALTNEY³⁹, 1966).

Utilizamos ainda a técnica de colheita de sangue, por embebição em papel de filtro, com o que se podem obter quantidades de sangue da ordem de 0,08 ml; após eluição obtêm-se extratos correspondentes a uma diluição inicial de soro de 1:8. Esta técnica já foi suficientemente estudada e utilizada por diversos autores, provando ser de particular valor, não só do ponto de vista de conservação do material, como também em termos da colheita, menos espetacular e dolorosa do que a venopunctura. Este último aspecto não é para desprezar-se em pediatria (KALTER⁵¹, 1963; BRODY et alii⁸, 1964; WORTH⁵⁹, 1964; CHIN et alii²¹, 1966; SOUZA & CAMARCO⁷⁸, 1966).

cientemente estudada e utilizada por diversos autores, provando ser de particular valor, não só do ponto de vista de conservação do material, como também em termos da colheita, menos espetacular e dolorosa do que a venopunctura. Este último aspecto não é para desprezar-se em pediatria (KALTER⁵¹, 1963; BRODY et alii⁸, 1964; WORTH⁵⁹, 1964; CHIN et alii²¹, 1966; SOUZA & CAMARCO⁷⁸, 1966).

Apresentamos a discussão dos resultados obtidos com as referidas técnicas, em relação aos atributos escolhidos.

Distribuição dos anticorpos segundo a idade — Depois do desaparecimento dos anticorpos maternos para o vírus respiratório sincicial (McCLELLAN et alii⁵⁸, 1961; MOSS, ADAMS & TOBINS⁶¹, 1963), apesar de ocorrer um aumento nos títulos fixadores de complemento, as porcentagens de positividade até os 2 anos de vida não são muito elevadas, conforme as observações de McCLELLAN et alii⁵⁸ (1961), que encontraram, no grupo de 6 a 11 meses, somente 6% com anticorpos para aquele vírus e no grupo de 1 ano de idade, uma porcentagem de positividade de 16%. HAMLING⁴⁰ (1964) refere-se a porcentagens de positividade de 38% em crianças de 1 a 2 anos e 56% a 93% em crianças de 4 anos. SALIBA, GLEZEN & CHIN⁷³ (1967) também se referem à presença de anticorpos para o vírus respiratório sincicial em 97% das crianças de 5 anos e idade superior.

As infecções pelo vírus respiratório sincicial ocorrem, principalmente, em crianças de idade compreendida entre 1 e 2 anos e, em virtude das múltiplas infecções subseqüentes, como já vimos, a grande maioria das crianças de mais idade possui anticorpos circulantes. Esta situação tende a produzir epidemias anuais nos grupos mais jovens suscetíveis e surtos não epidêmicos nos indivíduos de maior idade (JAMIESON, ALEXANDRE & TEAL⁴⁶, 1966).

Nossos resultados revelaram que 20,7% das crianças examinadas, com idade inferior a 1 ano, possuem anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial, em título igual ou superior a 8, porcentagem bem mais elevada do que as já referidas, se levarmos em consideração que os autores aceitaram como positivos os soros de título igual ou superior a 4. Por outro lado, analisando, separadamente, as porcentagens de positividade para os grupos etários de 3 a 6 meses e 7 a 11 meses, encontram-se valores de 21,5% e 19,7%. Um teste de proporções ao nível de 1%, aplicado a estes valores, leva a um resultado segundo o qual não é estatisticamente significativa a diferença entre as referidas porcentagens. Para um grande número de viroses respiratórias, cerca dos 6 meses de idade processa-se a queda de anticorpos de origem materna, à qual se segue a elevação resultante dos primeiros contactos com o agente infeccioso. O não encontro, em nossos resultados, de uma queda significativa nos títulos de anticorpos poderia sugerir um contacto precoce, das crianças estudadas, com o vírus respiratório sincicial, uma vez que as infecções por este vírus costumam ocorrer, mais freqüentemente, entre o primeiro e segundo ano de vida (GARDNER, ELDERKIN & WALL³², 1964). A este respeito não devem deixar de considerar-se os resultados das experiências feitas em animais e as observações de casos patológicos humanos, segundo os quais o organismo fetal é capaz de produzir anticorpos (SILVERSTEIN et alii⁷⁶, 1963; FUDENBERG & FUDENBERG³¹, 1964; BUFFE & BURTIN¹⁰, 1967).

Já a porcentagem de 36,7% de soros positivos que encontramos no grupo de crianças de 1 a 14 anos, é um pouco mais baixa do que a referida por alguns autores (McCLELLAND et alii⁵⁸, 1961; GARDNER, ELDERKIN & WALL⁵², 1964; WEIBEL et alii⁸⁷, 1966). Mesmo considerando este grupo subdividido nos grupos etários de 1 a 6 anos e 7 a 14 anos, as respectivas porcentagens de positivi-

dade, 30,3% e 44,4% se mostram mais baixas. No entanto, quando submetidas a teste de proporções é significativa a diferença entre elas, devendo a elevação corresponder ao aumento dos níveis de anticorpos que se processa com o decorrer da idade (PEREIRA, BRUNO-LÔBO & PEREIRA⁶⁸, 1961; DOGGERT²⁸, 1965; CANDEIAS & CHRISTOVÃO¹¹, 1966; CANDEIAS & HIMELFARB¹², 1966; JAMIESON, ALEXANDER & TEAL⁴⁶, 1966).

No grupo de crianças examinadas parecem ter sido freqüentes as infecções pelo vírus respiratório sincicial, durante o período de maior susceptibilidade, mas os contactos subsequentes com o agente etiológico não parecem ter tido a mesma intensidade dada a lenta elevação das porcentagens de positividade. Mesmo as porcentagens observadas nos grupos etários de 7 a 11 meses e de 1 a 6 anos, respectivamente, com valores de 19,6% e 30,3%, não se mostram diferentes quando analisadas estatisticamente ao nível já referido. Estas observações sobre a relação entre anticorpos circulantes e reinfeção pelo vírus respiratório sincicial, devem, no entanto, ser devidamente criticadas em virtude das recentes observações de COATES et alii²⁹ (1966) e de PIKE⁶⁵ (1967). Mais do que os anticorpos circulantes parecem ser importantes nas infecções e reinfeções pelo vírus respiratório sincicial, como por outros vírus respiratórios (SMITH et alii⁷⁷, 1966; LEADING ARTICLES⁵⁶, 1967), os anticorpos ao nível da mucosa nasal (BEEM³, 1967). Nós mesmos tivemos oportunidade de isolar o vírus respiratório sincicial de uma criança com a idade de 45 dias, gravemente enfêrma com uma síndrome de bronquiolite aguda, não tendo, no entanto, sido possível pesquisar os anticorpos circulantes de origem materna (CANDEIAS^{12a}, 1967).

Em relação ao vírus respiratório sincicial, como pode verificar-se pelos resultados obtidos, não são muito freqüentes os títulos superiores a 32, cujo total corresponde a uma porcentagem de 11,5%;

a grande maioria, 88,5%, encontra-se ao nível dos títulos 8 e 16, distribuição também observada por DOGGETT²⁸ (1965) em soros provenientes de várias partes do mundo. A êste respeito CHANOCK & FINBERG¹⁵ (1957) e BERGLUND, VIHMA & WICKSTRÖM⁵ (1965) sugerem que se inicie a titulação com a diluição 1:2 ou 1:4, no sentido de se evidenciar maior número de soros positivos, dada a possível insensibilidade da reação de fixação de complemento em soros de crianças muito jovens. Dentro dêste critério, as porcentagens de positividade que obteríamos, afastar-se-iam, ainda mais, dos valores encontrados por outros autores.

Numerosos inquéritos sorológicos sobre os adenovírus demonstram que as infecções ocasionadas por êstes ocorrem nos primeiros anos de vida (JORDAN et alii⁵⁰, 1956; WENNER et alii⁸⁸, 1957; JORDAN, BADGER & DINGLE⁴⁹, 1958; PEREIRA & McCALLUM⁶⁴, 1964; TOSI et alii⁸³, 1964). Com 5 anos de idade quase tôdas as crianças parecem ter sido infectadas, pelo menos, por um tipo de adenovírus e 50%, pelo menos, por quatro tipos, parecendo contribuir como fator de susceptibilidade o estado de nutrição deficiente (VAN DER VEEN⁸⁵, 1963).

Do mesmo modo que para o vírus respiratório sincicial, a queda nos títulos de anticorpos fixadores de complemento, de origem materna, começa a manifestar-se entre o quinto e o sexto mês de vida (JORDAN, BADGER & DINGLE⁴⁹, 1956; WENNER et alii⁸⁸, 1957; POTTER & SHEDDEN⁶⁸, 1963), sendo o seu declínio mais rápido do que o dos anticorpos neutralizantes.

Se considerarmos que os anticorpos fixadores de complemento são grupo-específicos (GINSBERG et alii³⁵, 1965; HILLMAN et alii⁴¹, 1955; ROWE et alii⁷², 1955), a reação de fixação de complemento evidenciará uma experiência com maior número de tipos do que a neutralização.

Por outro lado PARROTT et alii⁶² (1961) acham que as porcentagens de

positividade para anticorpos fixadores de complemento não devem corresponder à realidade, no grupo de crianças de idade inferior a 7 meses, pelo fato da reação de fixação de complemento perder certa sensibilidade. PORTNOY et alii⁶⁶ (1967) também chegam à conclusão de que a reação de fixação do complemento perde sua sensibilidade em crianças, talvez por resposta insuficiente de um sistema retículo-endotelial imaturo, ou por ausência de sensibilização prévia com o antígeno de grupo. Sugerem, mesmo, a complementação da referida reação pelas reações de neutralização ou inibição da hemaglutinação, a fim de a frequência das infecções por adenovírus não ser subestimada. Se a estas observações juntarmos as de WENNER et alii⁸⁸ (1957), que são de opinião que o aumento acentuado de anticorpos fixadores de complemento observado com a idade, pode estar relacionado com a capacidade que certos tipos têm de se difundir mais ou menos extensamente, e as de KATZ et alii⁵⁹ (1957) e HUEBNER⁴⁴ (1963), que se referem à desigual capacidade antigênica de certos tipos e GNESH³⁶ (1965), que sugere a possível interferência dos vírus da influenza com adenovírus, somos levados a concluir que os resultados de um inquérito sorológico, em termos de anticorpos fixadores de complemento para adenovírus, têm de ser muito cuidadosamente analisados.

No grupo de crianças de idade inferior a 1 ano a porcentagem de positividade por nós obtida foi de 23,8%, valor nitidamente mais baixo do que o obtido por CARVALHO¹³ (1960), que no grupo etário de 6 a 11 meses já refere porcentagens da ordem de 50%. Mesmo dividindo aquêle grupo nos grupos etários de 3 a 6 meses e 7 a 11 meses, as porcentagens encontradas foram, respectivamente, 24,6% e 22,9%, que correspondem a uma queda que não é estatisticamente significativa. Já no grupo de crianças de 1 a 14 anos de idade a porcentagem de positividade alcança o valor de 51,3%, sendo significativo esta-

tisticamente o aumento ocorrido entre a classe de 7 a 11 meses e 1 a 6 anos, a primeira com uma porcentagem de positividade de 22,9%, como já referimos, e a segunda, com 53,5% de soros positivos. Parecem mostrar êstes resultados que, no grupo de crianças examinadas, não só se observou queda inicial dos títulos, como a elevação posterior que se seguiu não foi tão acentuada como a observada por outros autores (CARVALHO, VERONESI & FAVA NETO¹⁴, 1957; VERONESI, CARVALHO & FAVA NETTO⁸⁶, 1958; MAGUREANU, GROBNICO & MUSETESCO⁵⁷, 1964). Os resultados observados por PEREIRA, BRUNO-LÔBO & PEREIRA⁶³ (1961) são os que mais se aproximam dos que obtivemos. Não devem, no entanto, ser muito valorizadas estas diferenças ou semelhanças, sabido como é que grande parte delas corre por conta da diversidade das técnicas utilizadas por cada um dos autores.

Os títulos de anticorpos fixadores de complemento não foram muito elevados, distribuindo-se a grande maioria na faixa de 8 e 16. Idênticos resultados foram obtidos por outros autores (CARVALHO¹³, 1960; MAGUREANU, GROBNSCO & MUSETESCO⁵⁷, 1964).

Sempre que se lança mão da reação de fixação de complemento, em inquéritos sorológicos, a primeira consideração a fazer diz respeito a especificidade da mesma: para o vírus respiratório sincicial esta reação é considerada, até o momento, como tipo específico e para os adenovírus ela revela anticorpos grupo-específicos, com indicação de infecção por qualquer dos tipos sorológicos existentes; já para os vírus parainfluenza as respostas heterotípicas criam um panorama mais complexo em virtude de sua extensão ao vírus da caxumba e ao vírus da doença de Newcastle (DEMEIO & WALKER²⁷, 1957; COOK et alii²⁴, 1959; HISIUNG, ISACSON & TUCKER⁴³, 1963). Esta imunidade cruzada é menos evidente nas reações de inibição da hemaglutinação e neutralização (CHANOCK et

alii¹⁹, 1960; HSIUNG, ISACSON & TUCKER⁴³, 1963) e os resultados obtidos devem refletir a experiência da população com êstes vírus. O aparecimento de anticorpos inibidores da hemaglutinação dá-se nos primeiros anos de vida estando, por altura do oitavo ano de vida, praticamente generalizado para os três tipos de vírus (MOGABGAB, DICK & HOLMES⁵⁹, 1961; CHANOCK et alii²⁰, 1963). Segundo as observações de LA PLACA & MOSCOVICI⁵⁵ (1962) existe uma boa correlação entre os anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação, sendo quase generalizada a observação segundo a qual todos os indivíduos que possuem anticorpos neutralizantes, também possuem anticorpos inibidores da hemaglutinação. Os resultados obtidos em nossa pesquisa de anticorpos inibidores de hemaglutinação, no grupo de crianças de idade inferior a 1 ano, correspondem às porcentagens de 39,7%, 42,8% e 46,1%, respectivamente, para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3, só tendo sido considerados positivos os soros de título igual ou superior a 16. Êstes resultados concordam com os observados por diversos autores (JENSEN, MINUSE & ACKERMANN⁴⁷, 1955; CHANOCK¹⁷, 1956; CHNOCK & FINBERG¹⁵, 1957; KAPIKIAN et alii⁵², 1960; TAYLOR-ROBINSON & BROWN⁸², 1966; EVANS et alii²⁹, 1967), exceção feita à porcentagem de soros positivos para o vírus parainfluenza 2. Não se observa queda estatisticamente significativa quando se comparam os grupos etários de 3 a 6 meses e 7 a 11 meses, mas a partir da idade de 1 ano processa-se uma elevação dos títulos inibidores da hemaglutinação. Analisado em conjunto, o grupo de crianças de idade superior a 1 ano apresenta 47,8% de soros positivos para o vírus parainfluenza 1, 55,7% para o vírus parainfluenza 2 e 69,7% para o vírus parainfluenza 3. Se considerarmos êste grupo subdividido no grupo etário de 1 a 6 anos e 7 a 14 anos, podemos calcular as porcentagens de positividade, que para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3 são, respectivamente:

41,8% e 55,1%; 48,3% e 64,6%; 59,8% e 81,5%. Este panorama sorológico dá-nos uma nítida perspectiva sobre a porcentagem particularmente elevada de indivíduos com anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus parainfluenza 2, achado que não corresponde às considerações feitas por TYRRELL⁸⁴ (1965) em sua revisão sobre alguns vírus respiratórios, onde salienta a nítida diferença entre a frequência de infecções pelos tipos 1 e 3 e o tipo 2, sendo este último o menos constantemente isolado. Porcentagem tão elevada adquirir ainda mais importância quando se sabe que o vírus parainfluenza 2 é antigênicamente bastante diferente dos vírus parainfluenza 1 e 3, sendo pouco frequente as reações heterotípicas com estes tipos (COOK et alii²⁴, 1959).

Quando se analisam as frequências de distribuição dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação no grupo de crianças de idade inferior a 1 ano e se comparam os resultados com os encontrados no grupo de crianças de idade compreendida entre 1 e 14 anos, vê-se que, em ambos os casos, as maiores porcentagens de positividade para os vírus parainfluenza 1 e 2 se distribuem em faixas nas quais os títulos ocupam os valores 16 e 32. Em relação ao vírus parainfluenza 3, a porcentagem mais elevada de soros positivos corresponde aos títulos 16 a 128. Também HSIUNG, ISACSON & TUCKER⁴³ (1963) observaram semelhante distribuição em crianças e adultos. TAYLOR-ROBINSON⁸¹ (1965) explica esta distribuição para o vírus parainfluenza do tipo 3, como resultante de múltiplas reinfecções.

Distribuição dos anticorpos segundo o sexo — Num grande número de doenças infecciosas, quando se analisa a distribuição de sua incidência segundo o sexo, a participação do sexo masculino é francamente sobrecarregada com maior contingente do quadro clínico em questão, exceção feita à coqueluche (GORDON & HOOD⁸⁸, 1951). Seja qual for a ex-

plicação para esta desproporção e nem sempre há uniformidade de opinião a respeito, sendo invocadas diferenças anatómicas, diferenças no comportamento social, ou simples características do ambiente, a verdade é que em algumas doenças a vírus, particularmente a rubéola (INGALLS et alii⁴⁵, 1960) e infecções por vírus parainfluenza (FISCHER³⁰, 1955) a desigualdade de distribuição é muito evidente.

Nossas observações em relação ao vírus respiratório sincicial e adenovírus não revelam diferenças estatisticamente significativas para qualquer dos vírus, tanto no grupo de crianças de idade inferior a 1 ano, como no grupo de idade compreendida entre 1 e 14 anos. Mesmo considerando o total de crianças estudadas, independentemente da idade, as porcentagens de positividade para o vírus respiratório sincicial são de 32,3% nos indivíduos do sexo masculino e 37,4% nos indivíduos do sexo feminino; para os adenovírus, estas porcentagens tomam os valores de 49,2% para o sexo masculino e 45,9% para o sexo feminino, valores que, tal como os primeiros, apresentam diferenças não significativas, estatisticamente.

Já em relação aos vírus parainfluenza pode observar-se que nas crianças de idade inferior a 1 ano, as diferenças ocorridas nas porcentagens de positividade para os vírus parainfluenza 2 e 3 poderiam ser devidas ao acaso, o mesmo não acontecendo para o vírus parainfluenza 1, com uma porcentagem de positividade de 51,4% nos indivíduos do sexo masculino e 25,8% nos indivíduos do sexo feminino. Não encontramos nenhuma razão ponderável capaz de ser utilizada na explicação desta situação. No grupo de crianças de idade superior a 1 ano, as diferenças de positividade observadas, para qualquer dos tipos de vírus parainfluenza, entre os dois sexos, são evidentes e pendem de modo significativo para o sexo masculino, fato que pode estar relacionado com a maior sus-

ceptibilidade dos indivíduos do sexo masculino aos quadros de laringotraqueobronquite aguda, em cuja etiologia os vírus parainfluenza parecem ter uma marcada participação (FISCHER³⁰, 1955). Englobando tôdas as idades, no total de 972 crianças observadas, as porcentagens de soros positivos para o vírus parainfluenza 1 foram de 60,1%, para os indivíduos do sexo masculino e 31,1%, para os do sexo feminino; para o vírus parainfluenza 2, 65,1%, para o sexo masculino e 41,2%, para o sexo feminino; para o vírus parainfluenza 3, 78,3% no sexo masculino e 52,9% no sexo feminino. As diferenças observadas entre os dois sexos são novamente acentuadas e significativas, continuando a ser válida, ou hipoteticamente válida, a explicação anteriormente referida.

Distribuição dos anticorpos, segundo a localização do domicílio — Por si só, a escolha do atributo, localização do domicílio já cria um problema de complexa solução, em virtude da dificuldade de conceituação do que seja, em nosso meio, zona urbana e zona rural. Naturalmente, no início de nosso trabalho não nos coube enfrentar o problema, uma vez que o critério que adotamos foi o seguido pelo SESA, donde recebemos o material para estudo. Mas ao discutirmos os resultados obtidos, em função do atributo escolhido, fomos, fatalmente, enredados na complexidade da questão, complexidade gritante que os numerosos conceitos aí estão testemunhado. Sem querermos entrar no mérito da posição assumida por RAMOS⁶⁹ (1961), segundo a qual parece ser lícito aceitar que nos países de estrutura sócio-econômica menos favorecida, os termos “rural” e “urbano” perdem muito do seu conteúdo, “quando encarados sob o ponto de vista dos problemas de saúde”, é evidente que as exceções encontradas têm de ser levadas em consideração. E a região onde o SESA desempenha suas atividades é uma delas, isto é, abstraindo-se do critério de classificação adotado por aquêle Serviço,

não há dúvida que as condições sócio-econômicas ao invés de esvaziarem os termos “rural” e “urbano” de seu conteúdo dão, pelo contrário, ao termo “urbano” um conteúdo bem mais promissor, em termos de saúde pública. Assim não fôsse e talvez não chegássemos aos resultados obtidos.

Quando se comparam as porcentagens de positividade para o vírus respiratório sincicial na zona urbana e zona rural, para o conjunto de tôdas as idades, encontram-se respectivamente os valores de 30,5% e 44,8%, cuja diferença é significativa e para a qual não encontramos outra explicação que não seja a da maior incidência de infecções ocasionadas por êstes vírus, em virtude de precárias condições do ambiente familiar, em termos de maior aglomeração de indivíduos, fato de particular importância na epidemiologia de certas viroses (DEL CAMPO & SANDRI²⁶, 1957; BRIMBLECOMBE et alii⁷, 1958) e que, eventualmente, pode ser extensivo às infecções pelo vírus respiratório sincicial. As porcentagens de positividade em crianças de idade inferior a 1 ano não são diferentes na zona rural e na zona urbana, o mesmo não sucedendo no grupo de crianças de idade compreendida entre 1 e 14 anos, onde a porcentagem de 47,4% na zona rural é significativamente diferente da encontrada na zona urbana, com o valor de 32,2%, e dentro do qual se encontra o espectro de idades em que são mais frequentes as infecções pelo vírus respiratório sincicial. Uma tentativa de explicação do comportamento sorológico do grupo de crianças de idade inferior a 1 ano, poderia levar-nos a aceitar a presença de anticorpos maternos como responsáveis por aquela distribuição das porcentagens de positividade nas zonas urbana e rural.

Esta diferença é particularmente evidente no caso dos adenovírus em que a zona rural participa com uma porcentagem de positividade de 70,1%, enquanto a zona urbana entra com uma porcentagem de 38,7%, quando considerado o

total de crianças, independentemente do grupo etário. A participação dos adenovírus em quadros diarréicos (GARDNER, MCGREGOR & DICK³³, 1960; GARDNER et alii³⁴, 1962; POTTER⁶⁷, 1964), pode explicar esta elevada porcentagem de positividade para a zona rural, onde condições sanitárias conhecidamente precárias muito contribuem para a explosão de surtos diarréicos. As porcentagens de positividade para os adenovírus nas zonas urbana e rural não se mostram diferentes no grupo de idade inferior a 1 ano; no grupo de mais de 1 ano de idade, aquelas diferenças são, novamente, a favor da zona rural. Também, neste caso os anticorpos maternos estariam justificando o diferente comportamento das crianças de idade inferior a 1 ano.

Finalmente, as porcentagens de positividade para os vírus parainfluenza 1, 2 e 3 não apresentam diferenças significativas nas zonas urbana e rural, quando se estuda a sua distribuição nas crianças de idade inferior a 1 ano e nas crianças de 1 ano e mais. Englobando, no entanto, tôdas as idades as porcentagens de positividade calculadas tomam os seguintes valores: vírus parainfluenza 1, 47,9% para a zona urbana e 43,8% para a zona rural; vírus parainfluenza 2, 57,1% para a zona urbana e 46,8% para a zona rural; vírus parainfluenza 3, 67,1% para a zona urbana e 65,4% para a zona rural. Só a diferença entre as porcentagens de positividade para o vírus parainfluenza 2 são significativas, fato para o qual não encontramos explicação, a menos que se considere que uma de suas características epidemiológicas, baixa endemicidade (CHANOCK et alii²⁰, 1963), crie condições particulares para um comportamento diverso daquele apresentado pelos tipos 1 e 3.

CONCLUSÕES

Terminamos o presente trabalho com alguns fatos que nos parecem bem estabelecidos e que passam a ser enunciados, como conclusões, do modo seguinte:

1. No grupo de 972 crianças estudadas, demonstramos a existência de anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e adenovírus e de anticorpos inibidores de hemaglutinação para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3.

2. Os anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial foram encontrados em 20,7% das crianças de idade inferior a 1 ano e 36,7% das crianças de idade compreendida entre 1 e 14 anos, distribuição sensivelmente inferior à referida noutras publicações. Com base nestes resultados amostrais, depositamos 95% de confiança na afirmação de que:

- a) das crianças de idade inferior a 1 ano, inscritas no SESA, a proporção das que possuem anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial está compreendida entre 14,3% e 29,6%;
- b) das crianças de 1 ano e idades superiores, inscritas no SESA, a proporção das que possuem anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial está compreendida entre 33,8% e 39,6%.

3. A distribuição dos anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial, segundo o sexo, não apresenta diferença significativa.

4. A distribuição dos anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial, segundo a localização do domicílio, apresenta diferença significativa; encontra-se porcentagem de positividade mais elevada na zona rural.

5. Os anticorpos fixadores de complemento para adenovírus foram encontrados em 23,8% das crianças de idade inferior a 1 ano e 51,3% das crianças de idade compreendida entre 1 e 14 anos, distribuição sensivelmente inferior à re-

ferida noutras publicações. Com base nestes resultados amostrais, depositamos 95% de confiança na afirmação de que:

- a) das crianças de idade inferior a 1 ano, inscritas no SESA, a proporção das que possuem anticorpos fixadores de complemento para adenovírus está compreendida entre 16,4% e 30,7%;
- b) das crianças de 1 ano e idades superiores, inscritas no SESA, a proporção das que possuem anticorpos fixadores de complemento para adenovírus está compreendida entre 48,2% e 54,4%.

6. A distribuição dos anticorpos fixadores de complemento para adenovírus, segundo o sexo, não apresenta diferença significativa.

7. A distribuição dos anticorpos fixadores de complemento para adenovírus, segundo a localização do domicílio, apresenta diferença significativa; encontra-se porcentagem de positividade mais elevada na zona rural.

8. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3 foram encontrados, respectivamente, em 39,7%, 42,8% e 46,0% das crianças de idade inferior a 1 ano e em 47,8%, 55,7% e 69,7% das crianças de idade compreendida entre 1 e 14 anos, distribuição semelhante à referida noutras publicações, exceção feita à relativa ao vírus parainfluenza do tipo 2 que, em nosso caso, é sensivelmente superior. Com base nestes resultados amostrais, depositamos 95% de confiança na afirmação de que:

- a) das crianças de idade inferior a 1 ano, inscritas no SESA, a proporção das que possuem anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3 está, respectivamen-

te, compreendida entre 31,5% e 47,9%; 34,5% e 51,1%; 37,6% e 54,4%;

- b) das crianças de 1 ano e idades superiores, inscritas no SESA, a proporção das que possuem anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3 está, respectivamente, compreendida entre 46,2% e 49,4%; 54,1% e 57,3%; 68,1% e 71,2%.

9. A distribuição dos anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3, segundo o sexo, apresenta diferenças significativas; encontram-se porcentagens de positividade mais elevadas no sexo masculino.

10. Entre os vírus parainfluenza, somente a distribuição dos anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus parainfluenza do tipo 2, segundo a localização do domicílio, apresenta diferença significativa; encontra-se porcentagem de positividade mais elevada na zona urbana.

SUMMARY

The author presents the results of a survey for respiratory syncytial virus and adenovirus complement fixing antibodies and parainfluenza viruses 1, 2, 3 haemagglutination inhibition antibodies in a group of 972 children between 3 months and 14 years of age. The filter paper method of collecting whole blood was used. Altogether, the percentage of children with complement fixing antibodies against respiratory syncytial virus and adenovirus were respectively 34.6% and 47.7%; 46.8%, 54.1% and 66.6% possessed haemagglutination inhibition antibodies against parainfluenza virus types 1, 2 and 3. A study on the distribution of the antibodies according to different age groups was also conducted. The

present study was undertaken, in order, to examine the distribution of antibodies according to sex and home localization. The following results were obtained: 32.3% of the boys possessed antibodies against respiratory syncytial virus, 49.2% against adenovirus and 60.1%, 65.5% and 78.3% against parainfluenza viruses 1, 2, 3 respectively; percentages in girls were 37.4%, 45.9%, 31.1%, 41.2% and 52.9% respectively. In the rural area 44.8% of the children possessed antibodies against respiratory syncytial virus, 70.1% against adenovirus, 43.8% against parainfluenza virus type 1 and 46.8% and 65.4% against parainfluenza viruses 2, 3; in the urban area the percentages observed were, respectively, 30.5%, 38.7%, 47.9%, 57.1% and 67.1%.

AGRADECIMENTOS

Manifestamos nosso reconhecimento à Srta. Eunice Pinho de Castro Silva e ao Sr. José Maria Pacheco de Souza, instrutores do Departamento de Estatística Aplicada, da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, pela orientação nas provas estatísticas que realizamos. Ao Dr. Amaury de Castro Monteiro, Diretor do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, os nossos agradecimentos pelo valioso auxílio que nos prestou na obtenção do material utilizado na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) — Diagnostic procedure for viral and rickettsial diseases. 3rd ed. New York, 1964.
2. ANDREWES, C. H. et alii — Propagation of common cold virus in tissue cultures. *Lancet*, 2(6785):346-547, Sept. 1953.
3. BEEM, M. — Repeated infections with respiratory syncytial virus. *J. Immunol.*, 98(6):1115-1122, July, 1967.

4. BEEM, M. et alii — Association of the chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children. *New Engl. J. Med.*, 263(11):525-530, Sept. 1960.
5. BERGLUND, B.; VIHMA, L. & WICKSTRÖM, J. — Respiratory syncytial virus studies on children hospitalized during an outbreak of respiratory illness in Finland. *Amer. J. Epidemiol.*, 81(3):271-281, May, 1965.
6. BRADSTREET, C. M. P. & TAYLOR, C. E. D. — Technique of complement fixation test applicable to the diagnosis of virus diseases. *Monthly Bull. Minist. Hlth*, 21:96-104, Jan. 1962.
7. BRIMBLECOMBE, F. S. W. et alii — Family studies of respiratory infections. *Brit. med. J.*, 1(5063):119-128, Jan. 1958.
8. BRODY, J. A. et alii — Use of dried whole blood collected on filter paper discs in adenoviruses complement fixation and measles haemagglutination-inhibition tests. *J. Immunol.*, 92(6):854-857, June, 1964.
9. BRUNO-LÓBO, G.; PEREIRA, M. S. & PEREIRA, H. G. — Estudos sobre adenoviroses no Rio de Janeiro. *An. Microbiol. Rio de J.*, 9(pt C):567-578, 1961.
10. BUFFE, D. & BURTIN, P. — Formation des immunoglobulines chez le fœtus et le jeune enfant. *Ann. Inst. Pasteur*, 112(4):468-475, Avr. 1967.
11. CANDEIAS, J. A. N. & CHRISTOVÃO, D. de A. — Pesquisas de anticorpos fixadores de complemento para vírus respiratório sincicial em grupos de população do Território Federal do Amapá, Brasil. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20(1):87-97, jun. 1966.
12. CANDEIAS, J. A. N. & HIMELFARB, L. — Pesquisa de anticorpos fixadores de complemento para vírus respiratório sincicial em habitantes da cidade de São Paulo. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20(2):207-213, dez. 1966.
- 12a. CANDEIAS, J. A. N. — Isolamento de vírus respiratório sincicial em crianças com quadros respiratórios agudos. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 9(1):27-30, jan. 1967.
13. CARVALHO, R. P. S. — Contribuição para o estudo dos adenovírus. São Paulo, 1960. (Tese de Doutorado — Fac. Med. Univ. S. Paulo).

14. CARVALHO, R. P. S.; VERONESI, R. & FAVA NETTO, C — Adenoviroses. Verificação de sua existência em São Paulo, através de inquérito sorológico (R.F.C.). *Rev. Med. Cirurg. S. Paulo*, 17(11/12):475-476, nov./dez. 1957.
15. CHANOCK, R. & FINBERG, L. — Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (C.C.A.). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Amer. J. Hyg.*, 66(3):291-300, Nov. 1957.
16. CHANOCK, R.; ROIZMAN, B. & MYERS, R. — Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (C.C.A.). II. Isolation, properties and characterization. *Amer. J. Hyg.*, 66(3):281-290, Nov. 1957.
17. CHANOCK, R. M. — Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J. exp. Med.*, 104(4):555-576, Oct. 1956.
18. CHANOCK, R. M. et alii — Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *New Engl. J. Med.*, 258(5):207-213, Jan. 1958.
19. CHANOCK, R. M. et alii — Serological response of individuals infected with parainfluenza viruses. *Amer. J. publ. Hlth*, 50(12):1858-1859, Dec. 1960.
20. CHANOCK, R. M. et alii — Myxoviruses parainfluenza. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 88(3):152-166, Sept. 1963.
21. CHIN, J. et alii — Filter paper disc method of collecting whole blood for serologic studies in children. *Amer. J. Epidemiol.*, 84(1):74-80, July, 1966.
22. COATES, H. V. et alii — An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Amer. J. Epidemiol.*, 83(2):299-313, Mar. 1966.
23. COMMITTEE ON ECHO VIRUSES — Enteric cytopathogenic human orphan (ECHO) viruses. *Science*, 122(3181):1187-1188, Dec. 1956.
24. COOK, M. K. et alii — Antigenic relationship among the "newer" myxoviruses (parinfluenza). *Amer. J. Hyg.*, 69(3):250-264, May, 1959.
25. DALLDORF, G. & SICKLES, G. M. — An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*, 108(2792):61-62, July, 1948.
26. DEL CAMPO, A. & SANDRI, G. — Osservazioni cliniche ed epidemiologiche su di una recente epidemia di malattia acuta respiratoria (A.R.D. nell'infanzia). *Minerva med.*, 48(98):4178-4184, dec. 1957.
27. DEMEIO, J. L. & WALKER, D. L. — Demonstration of antigenic relationship between mumps virus and haemagglutinating virus of Japan. *J. Immunol.*, 78(6):465-471, June, 1957.
28. DOGGETT, J. E. — Antibodies to respiratory syncytial virus in human sera from different regions of the world. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 32(6):849-853, June, 1965.
29. EVANS, A. S. et alii — Acute respiratory disease in University of the Philippines and University of Wisconsin students. A comparative study. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 36(3):397-407, 1967.
30. FISCHER, H. J. W. — Acute laryngo-tracheo-bronchitis. *Practitioner*, 175(1050):700-706, Dec. 1955.
31. FUDENBERG, H. H. & FUNDENBERG, B. R. — Antibody to hereditary human gamma-globulin (Gm) factor resulting from maternal fetal incompatibility. *Science*, 145(3628):170-171, July, 1964.
32. GARDNER, P. S.; ELDERKIN, F. M. & WALL, H. A. — Serologic study of respiratory syncytial virus infections in infancy and childhood. *Brit. med. J.*, 2(5424):1570-1573, Dec. 1964.
33. GARDNER, P. S.; Mc GREGOR, C. B. & DICK, K. — Association between diarrhoea and adenovirus type 7. *Brit. med. J.*, 1(5166):91-93, Jan. 1960.
34. GARDNER, P. S. et alii — Virus infection and intussusception in childhood. *Brit. med. J.*, 2(5306):697-700, Sept. 1962.
35. GINSBERG, H. S. et alii — Relation of the new respiratory agents to acute respiratory diseases. *Amer. J. publ. Hlth*, 45(7):915-922, July, 1965.

CANDEIAS, J. A. N. — Anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e adenovirus. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 2(1):44-67, jun. 1968.

36. GNESH, G. M. — Serologic surveys for respiratory virus antibodies in New York State. *Hlth. Lab. Sci.*, 2(2):89-92, Apr. 1965.
37. GOLD, R. Z. — On comparing multinomial probabilities. Brooks (Tex.), School of Aerospace Medicine, 1962.
38. GORDON, J. E. & HOOD, R. I. — Whooping cough and its epidemiological anomalies. *Amer. J. med. Sci.*, 222(3):333-361, Sept. 1951.
39. GWALTNEY, J. M. — Micro-neutralization test for identification of rhinovirus serotypes. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 122(4):1137-1141, Aug./Sept. 1966.
40. HAMBLING, M. M. — A survey of antibodies to respiratory syncytial virus in the population. *Brit. med. J.*, 1(5392):1223-1225, May, 1964.
41. HILLEMANN, M. R. et alii — Epidemiologic investigation with respiratory disease virus RI-67. *Amer. J. Publ. Hlth*, 45(1):203-210, Jan. 1955.
42. HORNSLETH, A. & VOLKERT, M. — The incidence of complement fixing antibodies to the respiratory syncytial virus in sera from Danish population groups aged 0,10 years. *Acta path. microbiol. scand.*, 62(3):421-431, Feb. 1964.
43. HSIUNG, G. D.; ISACSON, P. & TUCKER, G. — Studies of parainfluenza viruses. II. Serologic interrelationship in humans. *Yale J. Biol. Med.*, 35(6):534-544, June, 1963.
44. HUEBNER, R. J. — Viral respiratory disease in Americas. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 88(3):1-13, Sept. 1963.
45. INGALLS, T. H. et alii — Rubella: its epidemiology and teratology. *Amer. J. Med. Sci.*, 239(3):363-383, Mar. 1960.
46. JAMIESON, S. P.; ALEXANDER, J. G. & TEAL, F. — Respiratory syncytial virus epidemic. *Publ. Hlth*, London, 80(4):194-200, May, 1966.
47. JENSEN, K. E.; MINUSE, E. & ACKERMANN, W. W. — Serologic evidence of american experience with newborn pneumonitis virus (type Sendai). *J. Immunol.*, 75(1):71-77, July, 1955.
48. JOHNSON, K. M. et alii — Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. *Amer. J. Hyg.*, 71(1):81-92, Jan. 1960.
49. JORDAN Jr., W. S.; BADGER, G. F. & DINGLE, J. H. — A study of illness a group of Cleveland families. XV. Acquisition of type specific adenovirus antibodies in the first five year of life. *New Engl. J. Med.*, 258(21):1041-1044, May, 1958.
50. JORDAN Jr., W. S. et alii — A study of illness in a group of Cleveland families. X. The occurrence of adenovirus infections. *Amer. J. Hyg.*, 64(3):336-348, Nov. 1956.
51. KALTER, S. S. — Disc method for identification and titration of cytopathic viruses and detection of antibodies resulting from their infection. *J. Lab. Clin. Med.*, 62(3):525-534, Sept. 1963.
52. KAPIKIAN, A. Z. et alii — A study of the hemadsorption viruses (parainfluenza) and other viruses in children with and without respiratory disease. *Pediatrics*, 26(2):243-254, Aug. 1960.
53. KATZ, S. et alii — Studies of complement-fixing and neutralizing antibodies against certain adenovirus. *J. Immunol.*, 78(2):118-121, Feb. 1957.
54. KUROYA, M. et alii *apud* ANDREWS, C. H. — The common cold and other minor respiratory infections. *Brit. med. Bull.*, 15(3):221-224, Sept. 1959.
55. LA PLACA, M. & MOSCOVICI, C. — Distribution of parainfluenza antibodies in different groups of population. *J. Immunol.*, 88(1):72-77, Jan. 1962.
56. LEADING ARTICLES — A defense against viruses. *Lancet*, 1(7489):549-551, Mar. 1967.
57. MAGUREANU, E.; GROENICO, M. & MUSETESCO, M. — Anticorps adenovirus. Étude sérologique de leur incidence dans divers groupes de population. *Presse méd.*, 72(52):3113-3115, déc. 1964.
58. McCLELLAND, L. et alii — Studies of acute respiratory illnesses caused by respiratory syncytial virus. II. Epidemiology and assessment of importance. *New Engl. J. Med.*, 264(23):1169-1175, June, 1961.
59. MOGABGAB, M. J.; DICK, E. C. & HOLMES, B. — Parainfluenza 2 (CA)

- virus in young adults. *Amer. J. Hyg.*, 74(3):304-310, Nov. 1961.
60. MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E. & SAVAGE, R. E. — Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coriza. *Proc. Soc. exp. Biol. New York*, 92(3):544-549, July, 1956.
61. MOSS, P. D.; ADAMS, M. O. & TOBIN, J. O. H. — Serological studies with respiratory syncytial virus. *Lancet*, 1(7276):298-300, Feb. 1963.
62. PARROTT, R. H. et alii — Serologic studies over a 34-month period of children with bronchiolitis, pneumonia and minor respiratory diseases. *J.A.M.A.*, 176(7):653-657, May, 1961.
63. PEREIRA, M. S.; BRUNO-LÓBO, G. S. & PEREIRA, H. G. — Inquérito sorológico sobre a incidência de certas viroses respiratórias do Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, Rio de Janeiro, 9(pt. C): 579-589, 1961.
64. PEREIRA, M. S. & MacCALLUM, F. O. — Infection with adenovirus type 12. *Lancet*, 1(7326):198-199, Jan. 1964.
65. PIKE, R. M. — Antibody heterogeneity and serological reactions. *Bact. Rev.*, 31(1):157-174, June, 1967.
66. PORTNOY, B. et alii — The sensitivity of the complement fixation test for the detection of adenovirus infections in infants and children with lower respiratory disease. *Amer. J. Epidemiol.*, 86(2):362-371, Sept. 1967.
67. POTTER, C. W. — Adenovirus infections as an etiological factor in intersusception of infants and young children. *J. Path. Bact.*, 88(1):263-274, July, 1964.
68. POTTER, C. W. & SHEDDEN, W. I. H. — The distribution of adenovirus antibodies in normal children. *J. Hyg., Cambridge*, 61(1):155-160, Mar. 1963.
69. RAMOS, R. — Consideração sobre o problema da assistência médico-sanitária em áreas rurais. *Arq. Hig. São Paulo*, 88(26):109-119, jun. 1961.
70. RICHARDSON, F. M. — Preservation of liquid complement serum. *Lancet*, 2(6171):696-697, 1941.
71. ROWE, W. P. et alii — Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoid undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 84(3):570-573, Dec. 1953.
72. ROWE, W. P. et alii — Studies of the adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) group of viruses. *Amer. J. Hyg.*, 61(3): 197-218, Mar. 1955.
73. SALIBA, G. S.; GLEZEN, W. P. & CHIN, T. D. Y. — Etiologic studies of acute respiratory illness among children attending public schools. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 95(4):592-602, Apr. 1967.
74. SCHMIDT, N. J.; LENNETTE, E. H. & KING, C. J. — Neutralizing haemagglutination-inhibiting and group complement-fixing antibody response in human adenovirus infections. *J. Immunol.*, 97(1):64-74, July, 1966.
75. SEVER, J. L. — Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*, 88(3):320-329, Mar. 1962.
76. SILVERSTEIN, A. M. et alii — Fetal response to antigenic stimulus. II. Antibody production by the fetal lamb. *J. exp. Med.*, 117(5):799-812, May, 1963.
77. SMITH, C. B. et alii — Protective effect of antibody to parainfluenza type 1 virus. *New Engl. J. Med.*, 275(21): 1145-1151, Nov. 1966.
78. SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8(6):255-258, nov./dez. 1966.
79. STANLEY, N. F.; DORMAN, C. D. & PONSFORD, J. — Studies on the hepatoccephalomyelitis virus (HEV). *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 32(4):543-562, Aug 1954.
80. TAKATSY, G. *apud* SEVER, J. L. et alii — Serological diagnosis "en masse" with multiple antigens. *Amer. J. resp. Dis.*, 88(3):342-359, Sept. 1963.
81. TAYLOR-ROBINSON, D. — Respiratory virus antibodies in human sera from different regions of the world. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 32(6):833-847, June, 1965.

82. TAYLOR-ROBINSON, D. & BROWN, P. — Respiratory virus antibodies of persons living in isolated communities. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 34(6):895-900, 1966.
83. TOSI, H. C. et alii — Encuesta sero-epidemiologica sobre infecciones por adenovirus, realizadas por el método de gel difusión. *Ann. Fac. Med. Montevideo*, 49(3/4):428-431, 1964.
84. TYRRELL, D. A. J. — A collaborative study of the etiology of acute respiratory infections in Britain — 1961-64. *Brit. med. J.*, 2(5457):319-326, Aug. 1965.
85. VAN DER VEEN, J. — The role of adenoviruses in respiratory disease. *Amer. Rev resp. Dis.*, 88(3):167-180, Sept. 1963.
86. VERONESI, R.; CARVALHO, R. P. 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. S. Paulo*, 13(5):355-362, set. 1958.
87. WEIBEL, R. E. et alii — Respiratory virus vaccines. V. Field evaluation for efficacy of heptavalent vaccine. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 94(3):362-379, Sept. 1966.
88. WENNER, H. A. et alii — The epidemiology of acute respiratory illness. I. Observation on adenovirus infections prevailing in a group of families. *J. Infec. Dis.*, 101(3):275-283, Nov. 1957.
89. WORTH, R. M. — The filter disc blood collection method adapted for a mumps HAI serologic survey. *Amer. J. Hyg.*, 79(3):245-249, May, 1964.