

INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA EM CASOS DE CONJUNTIVITE
HEMORRÁGICA AGUDA EM REGIÕES DO ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL, 1984*

Sueko TAKIMOTO**
Eliseu Alves WALDMAN**
Margueritte S. PEREIRA***+
Mary O. ROEBUCK***
Maria Akiko ISHIDA**
Terezinha M. PAIVA**
Laercio J. GERBI**
Heloisa H.G.B. MELLES**
Tuneo ISHIMARU**

RIALA6/679

TAKIMOTO, S.; WALDMAN, E.A.; PEREIRA, M.S.; ROEBUCK, M.O.; ISHIDA, M.A.;
PAIVA, T.M.; GERBI, L.J.; MELLES, H.H.G.B. & ISHIMARU, T. — Investigação
etiológica em casos de conjuntivite hemorrágica aguda em regiões do Estado de
São Paulo, Brasil, 1984. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):199-205, 1989.

RESUMO: Nos meses de janeiro a março de 1983 e de 1984 ocorreram sucessivamente duas epidemias de conjuntivite hemorrágica aguda (C.H.A.) no Estado de São Paulo, a primeira atingindo exclusivamente a área litorânea e a segunda, mais extensa, abrangendo também regiões do planalto. A presente investigação apresenta dados sobre aspectos etiológicos da epidemia de C.H.A. ocorrida em 1984. Foram examinadas amostras pareadas de soro de 73 pacientes para a pesquisa de anticorpos e amostras da secreção conjuntival de 179 casos com C.H.A., para a tentativa de isolamento de vírus provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Houve conversão sorológica em 45,2% dos 73 pacientes examinados e presença de anticorpos específicos para EV-70 sem conversão sorológica em outros 19,2%. As proporções mais elevadas de casos positivos situaram-se entre pacientes maiores de 20 anos, com taxas de 70,6% para o grupo etário de 20 a 29 anos, de 55,6% na faixa de 30 a 39 anos e de 72,7% em maiores de 40 anos. Foram isoladas de amostras de secreção conjuntival 7 cepas de adenovírus, 1 de herpes-simples e 1 de EV-70. Nenhum dos soros pareados examinados foi positivo para adenovírus e, nos casos em que esses vírus foram isolados, não foi possível obter soros pareados para a comprovação sorológica de infecção. Os resultados obtidos confirmam a participação de EV-70 nessa epidemia. Não foram identificadas complicações neurológicas associadas à infecção pelo EV-70.

DESCRITORES: enterovírus-70, conjuntivite hemorrágica aguda, agente etiológico.

INTRODUÇÃO

A conjuntivite hemorrágica aguda (C.H.A.) descrita pela primeira vez em GHANA, África, em 1969¹⁰, caracteriza-se clinicamente por uma conjuntivite exsudativa, dolorosa, frequentemente

acompanhada de hemorragia subconjuntival. Manifestações sistêmicas são pouco significativas e a cura ocorre entre o 4º e o 7º dia de doença. Apresenta alta transmissibilidade e o período de incubação é curto, situando-se em torno de 24 a 48 horas. Comporta-se na comuni-

* Realizado no serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

***+ Virus Reference Laboratory, Colindale, Londres, Grã-Bretanha (in memoriam).

*** Virus Reference Laboratory, Colindale, Londres, Grã-Bretanha.

dade, na maioria das vezes, sob forma de epidemia de início abrupto.

Em 1970, uma epidemia de C.H.A. atingiu Singapura, durante a qual foi isolado um picornavírus, classificado como variante do coxsackievírus A-24 (CA-24)¹⁵. No ano seguinte, novas epidemias de C.H.A. são identificadas em diversas regiões da Ásia e outro picornavírus, até então desconhecido, é isolado, recebendo a denominação de enterovírus-70 (EV-70)^{8,12,13}.

Sabe-se hoje que a C.H.A. pode ser causada por esses dois enterovírus e, ainda, com menor frequência, pelo adenovírus tipo 11, que tem sido isolado durante algumas epidemias em que predominou o EV-70^{1,8}.

A introdução da C.H.A. no Brasil ocorreu em 1981 com epidemias atingindo os Estados do Pará, Amazonas e território Federal do Amapá^{6,17}. Entre o final de 1982 e o início de 1983, episódio semelhante ocorre no Estado de Mato Grosso, comprovando-se a participação de EV-70¹⁸. No verão de 1983 esse agravo é identificado pela primeira vez no Estado de São Paulo, acometendo sua área litorânea, especialmente a Baixada Santista. A investigação etiológica dessa epidemia não foi conclusiva por dificuldades operacionais.

A presente pesquisa tem por objetivo estudar aspectos etiológicos da segunda epidemia de C.H.A. ocorrida no Estado de São Paulo, abrangendo não só o litoral, mas também regiões do planalto.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro a março de 1984, as autoridades sanitárias do Estado de São Paulo receberam notificações de epidemias de C.H.A. nas regiões da Grande São Paulo, Baixada Santista, Sorocaba, Campinas, Ribeirão Preto e Vales do Ribeira e do Paraíba.

Com o objetivo de conhecer o agente etiológico dessas conjuntivites, providenciou-se o envio, ao Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), de 73 amostras pareadas de soros, e secreção conjuntival de 179 pacientes atingidos pela moléstia.

As secreções conjuntivais foram colhidas asepticamente de pacientes na fase aguda da doença, imersos em meio de transporte GLY (glicose, lactoalbumina, extrato de levedura) encaminhados imediatamente ao laboratório a 4°C onde foram estocados a -70°C, até serem inoculados em cultura de células.

A primeira amostra de sangue foi colhida na fase aguda da doença e a segunda cerca de 20 dias após. O sangue foi adequadamente centrifugado e o soro armazenado a -20°C.

Para a tentativa de isolamento do vírus, a secreção da conjuntiva foi inoculada em cultura de células BHK-21, HEp2, Vero e MDCK com leituras a cada 2 dias para verificação de efeito citopático. Após 14 dias em observação, foi feita a segunda passagem cega, seguida de terceira passagem após 14 dias. De 10 amostras de secreção conjuntival de doentes, foram enviadas alíquotas ao "Virus Reference Laboratory", Colindale, Londres, Grã-Bretanha, para a tentativa de isolamento onde seria utilizada MRC-5, cultura de células mais sensível à multiplicação do enterovírus 70.

Para a pesquisa de anticorpos específicos para EV-70 foi utilizada a técnica de microneutralização. O EV-70 (gentilmente cedido pela Dra. Margueritte S. Pereira, do "Virus Reference Laboratory", Colindale, Londres, Grã-Bretanha), utilizado como antígeno, foi replicado em cultura de células BHK-21 e titulado pelo método de REED e MUENCH¹⁴. A reação foi efetuada em microplacas de poliestireno, fazendo diluições seriadas de 25 µl de soros em duplicatas a partir de 1/8 a 1/128 aos quais foram adicionadas 100 TCD 50/25 µl de vírus. Após a incubação por 1 hora a 37°C adicionou-se à suspensão de células (100.000 cel./50 µl) em meio de Eagle com 5% de soro de galinha. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a 35°C e feitas leituras diárias ao microscópio. A ausência de efeito citopático no poço contendo soro mais vírus, quando o controle de vírus apresentava um título de 32 a 100 TCD50 na titulação simultânea, foi considerado como positivo. A elevação de 4 vezes ou mais no título de anticorpos na segunda amostra de soro, quando comparada com a primeira, foi considerada como conversão sorológica positiva.

Para a detecção de anticorpos para adenovírus foi utilizada a reação de fixação do complemento pela microtécnica já descrita anteriormente⁷.

RESULTADOS

Foram examinadas amostras pareadas de soros de 73 pacientes residentes nas regiões da Grande São Paulo, Baixada Santista e Vale do Paraíba, verificando-se conversão sorológica em teste de neutralização para EV-70 em, respectivamente, 25% e 66,7% dos casos, observada a mesma ordem de origem (tabela 1). Observou-se também a presença de anticorpos neutralizantes sem conversão sorológica em 20,5% e 18,2% dos pacientes das regiões da Grande São Paulo e da Baixada Santista, respec-

TABELA 1

Anticorpos neutralizantes para enterovírus-70 em soros de pacientes com C.H.A. em regiões do Estado de São Paulo, Brasil. 1984

Regiões	Soros pareados			
	Positivos		Negativos Nº (%)	Total Nº (%)
	com conversão Nº (%)	sem conversão Nº (%)		
Grande São Paulo	10 (25%)	8 (20,5%)	21 (53,8%)	39 (100%)
Baixada Santista	22 (66,7%)	6 (18,2%)	5 (15,1%)	33 (100%)
Vale do Paraíba	1 (100%)	—	—	1 (100%)
Total de amostras	33 (45,2%)	14 (19,2%)	26 (35,6%)	73 (100%)

* Dos 39 pacientes, 32 eram escolares na faixa etária de 7 a 14 anos, dos quais 6 (18,7%) apresentaram conversão sorológica para EV-70 e em 9 (28,1%) verificou-se presença de anticorpos nas duas amostras.

TABELA 2

Anticorpos neutralizantes para enterovírus-70 em soros de pacientes com C.H.A. em regiões do Estado de São Paulo segundo a faixa etária. 1984.

Faixa etária (anos)	Anticorpos neutralizantes em soros pareados			
	Positivos		Negativos Nº (%)	Total Nº (%)
	com conversão Nº (%)	sem conversão Nº (%)		
0-4	—	—	—	—
5-9	4 (30,8%)	1 (7,7%)	8 (61,5%)	13 (100%)
10-19	4 (17,4%)	6 (26,1%)	13 (56,5%)	23 (100%)
20-29	12 (70,6%)	3 (17,6%)	2 (11,8%)	17 (100%)
30-39	5 (55,6%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	9 (100%)
≥ 40	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	11 (100%)
Total de amostras	33 (45,2%)	14 (19,2%)	26 (35,6%)	73 (100%)

tivamente (tabela 1). Vale salientar que dos 39 pacientes estudados na região da Grande São Paulo, 32 eram crianças da faixa etária de 7 a 14 anos que freqüentavam escola de primeiro grau, localizada em área periférica do Município de São Paulo, onde ocorreu um surto de C.H.A. Destas crianças, (18,7%) apresentaram conversão sorológica para EV-70 e em outras 9 (28,1%) verificou-se a presença de anticorpos neutralizantes específicos já na primeira amostra sem a correspondente conversão sorológica.

Na tabela 2 observa-se que as faixas etárias que apresentaram maiores taxas de conversão sorológica foram aquelas situadas acima de 20 anos de idade com freqüências variando de 55,6% a 72,7%. A proporção de indivíduos que apresentavam anticorpos neutralizantes sem conversão

sorológica variou entre 7,7% no grupo etário de 5 a 9 anos e 26,1% no de 10 a 19 anos.

Processaram-se 179 amostras de secreção conjuntival originárias de 7 diferentes regiões do Estado na tentativa de isolamento de vírus. Em 9 delas foi possível o isolamento, sendo 7 adenovírus, 1 herpes simples e um 1 EV-70, este último obtido de paciente residente na Baixada Santista, região litorânea do Estado (tabela 3). O EV-70 foi isolado a partir de uma das 10 amostras da secreção enviadas ao "Virus Reference Laboratory", Colindale, Londres.

Em 43 das 170 amostras apresentadas na tabela 3 como negativas, verificaram-se alterações nas células BHK-21, porém não foi possível comprovar a presença de vírus.

TABELA 3

Isolamento de vírus a partir de amostras de secreção conjuntival de pacientes com C.H.A. de regiões do Estado de São Paulo, Brasil, 1984.

Regiões	Vírus isolados			Negativos	Total
	AD	HS	EV-70		
Grande São Paulo	5	1	-	85	90
Sorocaba	-	-	-	4	4
Baixada Santista	-	-	1	57	58
Campinas	-	-	-	3	3
Ribeirão Preto	-	-	-	5	5
Vale do Paraíba	1	-	-	6	7
Vale do Ribeira	1	-	-	11	12
Total de amostras	7	1	1	170	179

AD - adenovírus.

HS - herpes simples.

EV-70 - enterovírus 70.

Não foi identificada nenhuma afecção neurológica aguda no grupo de pacientes incluídos na presente pesquisa.

Reação sorológica de fixação de complemento realizada nesses mesmos soros pareados não detectou conversão sorológica para o grupo dos adenovírus. Lamentavelmente, não foram coletados soros pareados de 7 pacientes dos quais foram isolados adenovírus.

DISCUSSÃO

Os EV-70 e CA-24 constituem hoje amplo e interessante campo para estudos multi e interdisciplinares, fato que pode ser facilmente identificável à luz dos conhecimentos já disponíveis.

Ambos os vírus emergiram, como patogênicos à população humana, praticamente na mesma época e lugar, determinando idêntica doença, a C.H.A. Diferem, porém, quanto a determinados aspectos do comportamento clínico-epidemiológico, merecendo destaque a associação do EV-70 com afecções neurológicas agudas numa proporção estimada de 1/10.000 casos de C.H.A. e ao fato desse vírus determinar, periodicamente, verdadeiras pandemias, enquanto o CA-24-V não ocasiona quadros paralíticos e atinge a população causando epidemias localizadas. Ambos pertencem à família *Picornaviridae*, porém são distintos quanto às suas características imunogênicas e de estrutura molecular, existindo a possibilidade de que o EV-70 constitua, na rea-

lidade, não um único vírus mas um grupo de vírus relacionados^{3,8,9}.

A origem e a forma pela qual esses dois vírus introduziram-se na população humana é desconhecida. Existem evidências obtidas por meio de levantamentos sorológicos de que ambos teriam emergido, à semelhança do que ocorre com o vírus da influenza, provavelmente por mutação de vírus animais, entre eles de gatos e porcos².

O EV-70 comporta-se de forma diferente dos demais enterovírus, uma vez que se replica em culturas de células não originadas de primatas²⁰, o que reforça a hipótese de ter sua origem em populações animais.

O isolamento do CA-24 é mais fácil do que o EV-70, podendo ocorrer em cerca de 40% das amostras quando inoculado em cultura de células Hela, Hep-2 e HLF. O EV-70 é um vírus de difícil isolamento, com possibilidade de algum sucesso quando a amostra é colhida nas primeiras 24 horas de doença, citando-se entre as linhagens celulares mais sensíveis fibroblasto de pulmão de feto humano. Algumas cepas de CA-24 determinam paralisias em camundongos recém-nascidos, fato não verificado para EV-70.

Tem sido salientado que EV-70 foi isolado com alguma frequência durante as pandemias de C.H.A. ocorridas na década de 70, enquanto que raros têm sido os isolamentos desse vírus a partir de 1980⁵, apesar da sua participação ter sido comprovada sorologicamente em diversas epidemias ocorridas em diferentes continentes. Esse

comportamento é explicado como decorrente da imunidade conferida à população por infecções anteriores, o que determinaria a neutralização do vírus, dificultando ou impedindo o seu isolamento. Essa hipótese não se mostra consistente, ao menos em relação às Américas, pois este continente foi atingido pelo vírus somente a partir de 1979 e o número descrito de isolamentos é restrito.^{1,4,6,8,14,16,17,23}

As áreas mais vulneráveis à C.H.A. são as regiões tropicais, geralmente em sua porção litorânea, com alta densidade populacional e condições de promiscuidade e de higiene inadequadas. Determinadas características do ambiente, como a alta temperatura e a umidade relativa do ar elevada, favoreceriam a disseminação do EV-70 e do CA-24-V. No entanto, isto não impediu que regiões de clima frio e distantes do litoral fossem atingidas⁸.

Analisando os resultados da presente pesquisa, verificamos a conversão sorológica para EV-70 em 66,7% e 25% dos casos estudados, respectivamente, na Baixada Santista e na região da Grande São Paulo, resultado que nos permite confirmar a participação desse vírus na epidemia de C.H.A. ocorrida em diversos pontos do Estado de São Paulo, durante o verão de 1984.

Os 19,2% de indivíduos com anticorpos para EV-70 sem conversão sorológica e, especialmente, os baixos títulos verificados entre eles, sugerem a possibilidade de uma infecção anterior. Essa informação, acrescida de concomitância da epidemia ocorrida no verão de 1983, no litoral do Estado de São Paulo, com episódio semelhante em Mato Grosso¹⁸, onde foi confirmada a presença de EV-70, e da identificação, no município de São Paulo, entre março e julho de 1983, de casos de C.H.A. associados à infecção por esse vírus, torna consistente a hipótese de que a primeira epidemia de C.H.A., ocorrida no Estado de São Paulo em 1983, resultou da circulação do EV-70^{1,14}.

Cabe salientar que dos 39 indivíduos examinados, residentes na região da Grande São Paulo, 32 eram estudantes de uma única escola de pri-

meiro grau, localizada na área periférica do município de São Paulo, onde ocorreu um surto de C.H.A. A idade dessas crianças, variando entre 7 e 14 anos, pode explicar a baixa taxa de casos positivos para EV-70, pois esta faixa etária apresenta menor risco de infecção por esse enterovírus.

A distribuição dos pacientes que apresentaram conversão sorológica, segundo faixa etária, é compatível com aquela relatada na literatura. No entanto, ressalta-se o fato de essa mesma distribuição, entre os indivíduos com anticorpos mas sem conversão sorológica, não apresentar taxas de positividade dentro de um parâmetro proporcionalmente semelhante, especialmente a partir do grupo etário acima de 18 anos.

O resultado talvez mais notável da presente investigação diz respeito ao isolamento de uma cepa de EV-70 de paciente residente na Baixada Santista. Esta foi a única vez, no Brasil, em que este vírus foi isolado entre as poucas relatadas na literatura americana nesta década, comprovando de forma inofismável a introdução deste agente em nosso continente. O fato de ter sido isolada uma única cepa em 179 amostras examinadas pode ser explicado, em parte, porque a coleta da amostra não foi, muitas vezes, efetuada nas primeiras 24 horas da doença e talvez por problemas de conservação no transporte da amostra.

As dificuldades operacionais para o isolamento do EV-70 e para obtenção em condições adequadas de amostras pareadas de soro para testes de neutralização evidenciam a necessidade do desenvolvimento e padronização de técnicas imunoenzimáticas e de imunofluorescência para a demonstração de anticorpos específicos da classe IgM²⁴. Tais imunoglobulinas podem ser detectadas até 4ª semana após o início da doença em grande número de pacientes atingidos pela C.H.A.

Aspectos importantes da clínica e epidemiologia do EV-70 ainda pouco estudados dizem respeito às complicações neurológicas associadas à infecção por esse vírus, ao seu comportamento nas fases "silenciosas" da C.H.A. e, por fim, aos fatores que desencadeiam as epidemias^{21, 22}.

RIALA6/679

TAKIMOTO, S.; WALDMAN, E.A.; PEREIRA, M.S.; ROEBUCK, M.O.; ISHIDA, M.A.; PAIVA, T.M.; GERBI, L.J.; MELLES, H.H.G.B. & ISHIMARU, T. - Etiologic study of acute haemorrhagic conjunctivitis in regions of S o Paulo State, Brasil, 1984. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):199-205, 1989.

ABSTRACT: Epidemics of acute haemorrhagic conjunctivitis occurred in the S o Paulo State limited to the sea coast areas in 1983 which was succeeded by epidemics in other regions of the state in 1984. The present investigation presents data on the etiological aspects of conjunctivitis during the epidemic of 1984. Paired sera of 73 cases and conjunctival swabs of 179 patients living in different regions of S o Paulo state were examined for respectively, serology and virus isolation attempts. Neutralization test detected serologic conversion for EV-70 in 45,2% of patients examined while 19,2% had antibodies in the acute phase sera. Persons older than 20 years were the most affected by the virus. The proportion of positive cases in the age groups of 20-29, 30-39 and older than 40 were respectively, 70,6%, 55,6% and 72,7%. Adenovirus, herpes simples and EV-70 were isolated from the conjunctival secretion of seven, one and one patients, respectively. Despite adenovirus have been isolated of higher number of cases serologic tests did not detect any adenoviral infection, due to the unavailability or paired sera of persons from which adenoviruses were isolated. The results obtained confirm the participation of EV-70 in the epidemic of 1984. During this period no evidence of neurological diseases were registred.

DESCRIPTORS: enterovirus-70, acute haemorrhagic conjunctivitis, etiologic agent.

REFER NCIAS BIBLIOGR FICAS

1. AOKI, K.; KAWANA, R.; MATSUMOTO, I.; MAEKAWA, H.; SAWADA, H.; SAKURADA, N.; NOBREGA, M.J.; DELREY Filho, M. & BELFORT Jr., R. — An epidemic of acute haemorrhagic conjunctivitis in the city of S o Paulo. *Ja. J. Ophthalmol*, 31:532-7, 1987.
2. CHRISTIE, A.B. - Changing aspects of infectious diseases (acute haemorrhagic conjunctivitis; acquired immune deficiency syndrome) In: CHRISTIE, A.B. *Infectious diseases: epidemiology and clinical practice*, 4th ed., 1987. p.22-42.
3. CHRISTIE, A.B. - Enterovirus Infections (coxsackie virus and echovirus) In: CHRISTIE, A.B. *Infectious diseases epidemiology and clinical practice*, 4th ed., 1987. p.753-81.
4. CENTER FOR DISEASES CONTROL . — Acute haemorrhagic conjunctivitis caused by *Coxsackievirus A-24*- Caribbean. *JAMA*, 257(22): 3039-40 1987.
5. DESMYTER, J.; COLAERT, J.; MAERTEND. K. & MUYEMBE, T. — *Enterovirus-70* haemorrhagic conjunctivitis in Zaire, 1981 versus 1972. *Lancet*, 1054-55, nov. 5, 1981.
6. GABBAY, Y.B.; FREITAS, R.B.; SANTOS, E.C.D. & LINHARES, A.C. — Surto de conjuntivite hemorr gica aguda em Bel m, Par  (Nota Pr via). *Rev. paul. Med.*, 3(2): 93-6, 1981.
7. HAWKES, R.A. — General principals underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamidial Infections*, 5 th ed. Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. p. 35-42, 1979.
8. HIERHOLZER, J.C.; HILLIARD, K.A. & ESPOSITO, J.J. — Serosurvey for "acute haemorrhagic conjunctivitis" virus (EV-70) antibodies in the south-eastern United States, with review of the literature and some epidemiologic implications. *Am. J. Epidemiol*, 102(6): 633-44, 1975.
9. HIGGINS, P.G.; SCOTT, R.J.; DAVIES, P.M. & GAMBLE, D.R. — A comparative study of viruses associated with acute haemorrhagic conjunctivitis. *J. clin. Pathol*, 27(4): 292-6, 1974.
10. KAIWAR, R.; PAL, S.R.; GANGWAR, D.N.; SEHGAL, A.K. & BISWAS, J. — Sporadic cases of acute haemorrhagic conjunctivitis due to Enterovirus type 70. *Indian J. med. Res.*, 78:445-9, 1983.
11. KONO, R. — On the causative agent of acute haemorrhagic conjunctivitis and its epidemiology. *Acta. Soc. Ophthalmol. Jap.*, 78(7):333-41, 1974.
12. KONO, R.; SASAGAWA, A.; ISHII, R.; SUGIURA, S.; UCHIDA, Y.; KAMEYA, M.A.K. & KANEKO, M. — Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet*. 1191-94, Jun. 3, 1972.
13. MIRKOVIC, R.R.; SCHMIDT, J.J.; YIN-MURPHY, M & MELNICK, J.L. — Enterovirus etiology of the 1970 Singapore epidemic of acute conjunctivitis *Intervirology*, 4: 119-27, 1974.
14. NOBRECA, M.Y.; DEL REY Filho, M.; BELFORT Jr., R. AOKI, K.; KAMANA, R.; MATSUMOTO, I.; MAEKANA, H.; SWABA, H. el SAKURADA, N. — Estudo prospectivo de casos de conjuntivite viral aguda na cidade de S o Paulo. Caracteriza o do *Enterovirus - 70* (Con juntivite Hemorr gica Agudra). *Rev. Assoc. Brasil.* 32(3/4): 47-50, 1986.
15. REED, L.J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg*, 27: 493-7, 1938.

16. REEVES, W.C.; BRENES, M.M.; QUIROZ, E.; PALACIOS, Y.; CAMPOS, G. & CENTENA, R. — Acute haemorrhagic conjunctivitis epidemic in Colon, Republic of Panama. *Am. J. Epidemiol.* 123(2): 325-35, 1983.
17. SANTOS, E.C.O.; GABBAY, I.B.; FREITAS, R.B. & LINHARES, A.C. — Surto de conjuntivite hemorr gica aguda no norte do Brasil. *Bol. Epidemiol.* 15 (2): 11-9, 1983.
18. SANTOS, E.O.; MACEDO, O.; GOMES, M.L.C. & NAKAUT, C.M. — Conjuntivite hemorr gica aguda, em Cuiab , Mato Grosso, Brasil, 1983. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 29 (1): 47-52, 1987.
19. YIN-MURPHY, M. An epidemic of picornavirus conjunctivitis in Singapore. *Southeast Asian J. trop. Med. pub. Health*, 3 (3): 303-9, 1972.
20. YOSHII, T. NATORI, K. 7 KONO, R. - Replication of Enterovirus — 70 in non primate cell cultures. *J. gen. Virol*, 36: 377- 84, 1977.
21. WADIA, N.H.; KATRAK, S.M.; MISRA, V.P.; WADIA, P.N.; MIYAMURA, K.; HASHIMOTO, K.; OGINO, T.; HIKUI, T. & KONO, R. — Polio-like motor paralysis associated with acute haemorrhagic conjunctivitis in a outbreak in 1981 in Bombay, India: clinical and serologic studies. *J. infect. Dis.*, 147(4): 660-8, 1983.
22. WADIA, N.H.; WADIA, P.N.; KATRAK, SM.; MISRA, V.P. — Neurological manifestation of acute haemorrhagic conjunctivitis. *Lancet*. I: 528-29, suppl. 5, 1981 (letter).
23. WATERMAN, S.H.; CASA-BENABE, R.; HATCH, M.H.; BAILEY, R.E.; MUNOZ-JIMENEZ, R.; RAMIREZ-RAMIRETE, R. & RODRIGUES-BIGAS, M. — Acute haemorrhagic conjunctivitis in Puerto Rico, 1981-1982. *Am. J. Epidemiol.*, 120(2): 395-403, 1984.
24. WULFF, H.; ANDERSON, O.Y.; PALLANSCH, M.A. 7 CARVALHO, R. - P.S. Diagnosis of enterovirus-70 infection by demonstration of IgM antibodies. *J. med. Virol.*, 21:321-7, 1987.

Recebido para publica o em 10 de agosto de 1989

