



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
I Z T A C A L A

"ENCUESTA SEROLOGICA DE ENTEROVIRUS 70 EN UNA
COMUNIDAD DEL SURESTE DE MEXICO (CHIAPAS)"

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G I A

P r e s e n t a

AURORA MUÑOZ SALVADOR



1 9 8 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con cariño y gratitud a mis padres:

ANTONIO MUÑOZ CAMARGO

ISAURA SALVADOR DE MUÑOZ

quienes brindándome su amor, confianza
y apoyo en cada momento de mi vida han
hecho posible que mi esfuerzo se vea -
coronado con la realización del presen
te.

A mis Hermanos:

ROSAURA

RAFAEL

ANA

Nunca digas "no puedo", antes de cansar
tu voluntad y tu esfuerzo agotarlo, por
qué quizá en el último instante, cuando
crees perdida toda esperanza, encuentres
la solución que buscas.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco a mi director de tesis el Maestro en Ciencias, Luis Padilla Noriega, su valiosa y - constante asesoría durante las distintas etapas que comprendió el presente trabajo.

Así mismo, agradezco a la Q.B.P. María Teresa Alvarez y Muñoz su colaboración e interés en la realización de este trabajo.

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	VI
INTRODUCCION	
ANTECEDENTES HISTORICOS.....	1
CUADRO CLINICO.....	5
ETIOLOGIA.....	6
CARACTERISTICAS DEL VIRION.....	7
METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DEL ENTEROVIRUS (EV-70).....	8
AISLAMIENTO DEL VIRUS.....	9
EPIDEMIOLOGIA.....	10
OBJETIVO.....	11
MATERIAL Y METODO	
AREA GEOGRAFICA ESTUDIADA.....	12
COLECCION DE MUESTRAS.....	12
TIEMPO DE RESIDENCIA DE LOS CAMPAMENTOS.....	14
DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO.....	16
CULTIVO CELULAR.....	16
PROCESAMIENTO DE SUEROS.....	18
SUEROS DE REFERENCIA.....	18
VIRUS.....	18
TITULACION DEL VIRUS.....	19
PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACION.....	19

	Pag.
RESULTADOS	
SEROPOSITIVIDAD A EV-70 POR CAMPAMENTO.....	21
TITULOS DE LOS SEROPOSITIVOS.....	21
DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO DE LOS SEROPOSITIVOS.....	24
INFECCION INTRAFAMILIAR.....	24
LUGAR DE ORIGEN.....	24
MIGRACION.....	28
DISCUSION.....	32
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	37

RESUMEN

La Conjuntivitis Hemorrágica Aguda se presentó por primera vez en América en el año de 1981, entre los países afectados se encontraron Guatemala y México.

El objetivo de este trabajo fue realizar una encuesta serológica de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en comunidades fronterizas de Chiapas, con el fin de conocer el estado de inmunidad comunitaria en anticuerpos neutralizantes contra Enterovirus 70.

Se obtuvo un mayor porcentaje de seropositividad en el grupo de mexicanos (9.6%) que en el de refugiados guatemaltecos (3.8%), se atribuyó esta diferencia a los hábitos migratorios. Los títulos en ambos grupos en su mayoría fueron bajos (cerca - nos al valor de corte 1:8).

La incidencia de la CHA en los mexicanos según la edad ó sexo no presentó diferencias importantes, pero se observó una distribución "intrafamiliar" de los casos positivos.

La ausencia de seropositivos menores de tres años en los grupos estudiados nos sugiere que estas comunidades no han estado en contacto con el Enterovirus 70 después del brote de 1981-82.

"ENCUESTA SEROLOGICA DE
ENTEROVIRUS 70 EN UNA
COMUNIDAD DEL SURESTE DE
MEXICO (CHIAPAS)".

INTRODUCCION

ANTECEDENTES HISTORICOS

La enfermedad ocular denominada Conjuntivitis Hemorrágica Aguda (CHA) fue conocida en los primeros años de su aparición como "Apolo II", registrándose los primeros casos al final de la década de 1960 en el hemisferio oriental afectando a países de Africa, Asia, Europa y Oceanía (Mapa I); la CHA ha adquirido relevancia en los últimos años en el hemisferio occidental debido a la aparición de algunos brotes epidémicos.

La CHA se presentó por primera vez en el continente africa no en 1969 afectando Ghana (Accra) y extendiéndose rápidamente a lo largo del oeste de la costa hasta el norte de Africa en 1969-70. Durante 1969 los países afectados fueron: Costa de Marfil, Nigeria y Camerún (Lobe); en 1970 Togo, Dohomey, Liberia, Gambia, Sierra Leona y Senegal. Posteriormente (1970-71) la enfermedad avanzó por el norte de Africa a través de Marruecos y en 1971-72 por Argelia, Túnez, Libia, Egipto y Kenia (este de Africa) (7).

El número de países con epidemias de CHA disminuye a partir de 1972 y en cambio aparecen brotes en áreas afectadas con anterioridad. Es notable la ausencia del registro de la enfermedad durante 1974-1979 y la reaparición del padecimiento en 1980 en Kenia (Nairobi) y en Zaire y Nigeria durante 1981-82.

Al igual que en Africa, Asia también se vió afectada por brotes de CHA siendo prevalente en Indonesia (Java) y Vietnam desde 1969, propagándose a través del sureste de Asia principalmente durante 1971-72 llegando hasta Japón y la India. De esta forma, en 1970 Java (Yakarta, Surabaya) y Bali se vieron afectados por epidemias de CHA. Durante 1971 se propaga a otros países de Asia incluyendo Indonesia (Borneo y Sumatra), Singapur, Birmania, India (Bombay, Calcuta, Lucknow, Amritsar, Poone, Madrá y Nueva Delhi), Pakistán, Malasia, Tailandia, Vietnam, Gambia, Laos, Hong Kong, China (provincia de Taiwan), Filipinas (Amlan, Luzon y Manila), Corea y Japón (Kyushu, Tokyo, Hokkaido y Sapporo) (23,26). En 1972 son afectados nuevamente Indonesia, Singapur (1972-73), Tailandia (Bankok) y se detecta por primera ocasión en Yemen (Sana).

A mediados de la década de 1970 se reducen los brotes epidémicos y al igual que en Africa hasta 1980 se vuelven a presentar brotes de CHA en Malasia y Singapur, en 1981-82 en la República Democrática de Yemen, la India (Nueva Delhi, Calcuta, Madrás y Bombay), Pakistán y Laos (29).

En el continente europeo no hubo pandemias de CHA, presentándose solamente brotes aislados sobre todo en clínicas oftalmológicas en Inglaterra (Londres), Holanda (Rotterdam) y Rusia

(Moscú) durante 1971, Francia y Benelux (Bélgica, Holanda y Luxemburgo) en 1972 y a su vez Yugoslavia y Francia (Lyon) en 1973 (23).

En Oceanía solo se reporta la presencia de este padecimiento en Nueva Caledonia (Neumea) durante 1972-74 (14).

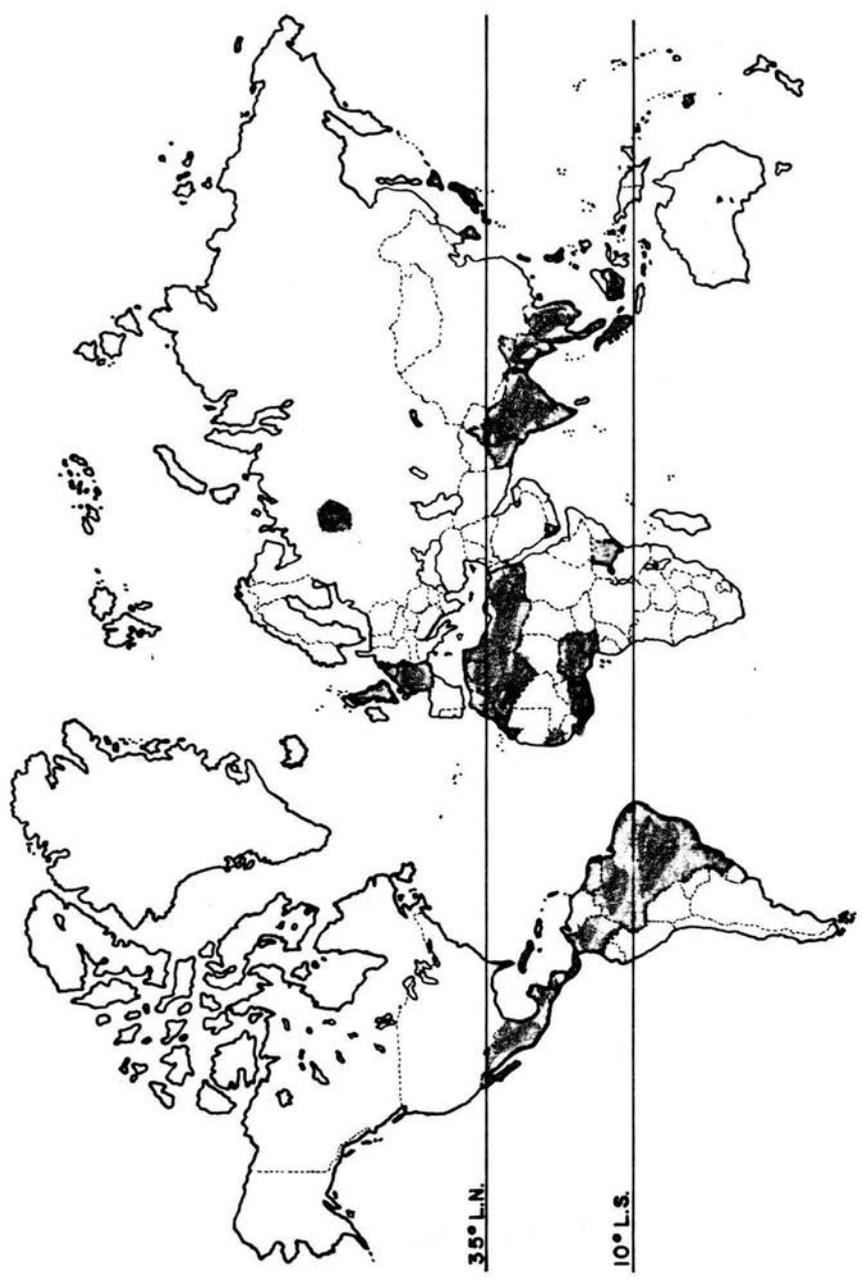
En el hemisferio occidental este padecimiento fue desconocido hasta el año de 1981, en el que se expresa con un carácter epidémico. En febrero de 1981 se registró el primer brote de CHA en Brasil (2), de donde se extiende a otros países de América del Sur como Colombia, Guayana y Surinam. Durante el primer semestre de 1981 ocurre un gran número de casos en las Islas del Caribe incluyendo entre otras: Trinidad-Tobago, Islas Bahamas y Cuba. En América del Norte sólo se han registrado casos en Florida y Carolina del Norte. En América Central 7590 casos fueron vistos en Panamá (3), 7000 casos ocurrieron en Costa Rica, 2500 en Honduras (24) y también fueron afectados Guatemala (21) y Belice, esta último con 12000 casos (3).

En el año de 1981 en México se detectó CHA en el sureste del país, extendiéndose al Golfo de México y en 1982 se propagó a las regiones litorales del Pacífico.

Durante 1981 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) que amparaba el 36% de la población mexicana (5,10) detectó 55 532 casos de CHA, siendo los estados más afectados: Veracruz con 16 290 casos, Yucatán con 10 548, Tabasco con 7 835, Campeche con 7 431, Quintana Roo con 6 342, Oaxaca con 743, Nayarit con 615 y Chiapas con 550 (12), mientras que en 1982 se detectaron solo 10 130 casos, principalmente en Guerrero con

MAPA.- I

DISTRIBUCION MUNDIAL DE LA CHA POR EV-70



5 298, Veracruz con 1 667, Nayarit con 1 102, Oaxaca con 806 y Yucatán con 668 (11). El año siguiente 1983 ya no se detectaron casos adicionales (13).

CUADRO CLINICO

La CHA tiene un cuadro clínico característico, se presenta en forma explosiva después de un período de incubación corto de 24 horas, iniciándose unilateralmente, con una inmediata inflamación del párpado, congestión ocular, lagrimeo, dolor intenso, prurito, sensación de cuerpo extraño, fotofobia y hemorragia subconjuntival variando desde una discreta petequia a una gran mancha de franca hemorragia (23) a menudo se ven involucrados ambos ojos; la hemorragia subconjuntival se detecta en la conjuntiva bulbar cerca del fornix superior (24), puede extenderse a la mitad superior de la conjuntiva bulbar y al fornix inferior (21,24) siempre acompañado de una inflamación conjuntival. La córnea puede ser afectada y la lesión puede ocasionar queratitis epitelial que da origen a dolor y visión borrosa (21). Otros síntomas ocasionados son linfadenopatía preauricular, foliculitis y descarga serosa la cual puede llegar a ser mucopurulenta cuando hay una infección secundaria por bacterias (Neisseria gonorrhoeae y Proteus mirabilis) (24).

Además se han asociado a la conjuntivitis hemorrágica aguda complicaciones neurológicas, siendo las principales afecciones: radiculomielitis lumbosacra, lesión múltiple ó única de los nervios craneales, mielitis transversa y parálisis asimétrica de extremidades (27). Basándose en las epidemias que se han

suscitado en diferentes lugares a través del tiempo y el número de casos con afección nerviosa presentados, se afirma que las complicaciones neurológicas no son muy frecuentes, ya que en Taiwan, de cada 10 000 casos con CHA, sólo uno presentó secuelas neurológicas, estimándose por lo anterior, que en la India durante la epidemia de 1981, de un total de 15 a 20 millones de individuos afectados por CHA, 4 000 casos presentan secuelas neurológicas (19,26).

Los síntomas neurológicos pueden desarrollarse de dos días a un mes después de la conjuntivitis (21) y con pocas excepciones las complicaciones neurológicas involucran a pacientes adultos (21) con un mayor índice de afección en el sexo masculino y clase social baja (19).

La CHA es una enfermedad autolimitante, en donde el aplicar un régimen terapéutico no altera el curso evolutivo de la enfermedad (24). Empieza una notable mejoría por el segundo ó tercer día y es generalmente completa por el séptimo o doceavo día (7); el edema mejora por el cuarto día y la hemorragia conjuntival bulbar (superior o inferior) desaparece alrededor de una semana, aunque en algunos pacientes con una respuesta foliular se ha observado una completa resolución tres o cuatro semanas después.

ETIOLOGIA

El Enterovirus 70 (EV-70) es el agente etiológico más frecuente que ha estado implicado en las pandemias de conjuntivitis hemorrágica aguda en el mundo, se menciona también, pero

con mucho menor frecuencia, a Coxsachievirus A-24 y a ciertos adenovirus como son: el AV-11, AV-8 (4) y AV-4.

Las cepas aisladas durante 1971-72 fueron: J670/71 y 648/71 Japón, EC 146/71 Singapur, R 6/71 y R 20/71 Marruecos, T 435/71 y T 471/71 Taiwan, Eng 23356/71 y Eng 202554/71 Inglaterra, HK 3454/71 Hong Kong, AE 7/72 Tailandia, Indo 13476/72 Indone - sia. Estas cepas estuvieron antigénicamente relacionadas por la prueba de neutralización, lo cual indica que la pandemia que se suscito fue de un solo serotipo, representado por la primera cepa aislada en Japón J670/71.

La cepa J670/71 fue originalmente aislada de un raspado ocupar de un individuo de 43 años, sexo masculino el 25 de diciembre de 1971 en Hokkaido Japón (7).

CARACTERISTICAS DEL VIRION

El EV-70 responsable de la conjuntivitis hemorrágica aguda es un picornavirus con características de enterovirus, su genoma de cadena única es un ácido ribonucléico demostrado por la replicación del virión en presencia de 5-yodo-2deoxiuridina, con un peso molecular de 2.5×10^6 Daltons (21), el virión posee una simetría icosaédrica, con un diámetro de 22 a 29 nm y su densidad es de 1.327 - 1.345 g/ml en Cloruro de Cesio (21,23). Contiene 4 fracciones protéicas denominadas P1, P2, P3 y P4 con un peso molecular de 35 000, 25 000, 27 000 y 9 000 respectivamente (21).

La infectividad del virión no se ve afectada al tratarlo con solventes de lípidos como son: el dietil-eter, cloroformo ó

el deoxicolato de sodio (9,23), lo cual indica que no tiene envoltura lipídica. También es resistente a ácidos (pH 3) y es protegido contra la inactivación por el calor con $MgCl_2$.

En las células infectadas se encuentran cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de aproximadamente 300 m μ , observándose de 20 a 40 por célula infectada (1).

METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE ENTEROVIRUS 70 (EV-70)

Se ha podido hacer una descripción del EV-70 gracias al empleo de diversas técnicas de laboratorio y al constante esfuerzo e interés de los investigadores. Estos procedimientos incluyen métodos específicos de aislamiento, de purificación y de caracterización bio-físico-química, de estos últimos se emplean como pruebas serológicas para la identificación de EV-70 las pruebas de neutralización, de inhibición de la hemaglutinación, de fijación de complemento, de inmunofluorescencia y de formación de placas (8,21).

Instrumentos indispensables para el estudio de EV-70 son los cultivos celulares y la inoculación de animales de laboratorio. Los cultivos celulares empleados para el Enterovirus 70 son líneas celulares de MA-104, VERO, VI-38, HeLa y cultivos primarios de embrión humano de: células de riñón, fibroblastos de pulmón, conjuntiva, órganos de epitelio respiratorio ciliado (tráquea, nariz) y cultivo de amnios humano (1,7,23). Los animales de experimentación más empleados para reproducir la enfermedad son: conejos, monos (21) y ratones recién nacidos.

El ensayo que comunmente se emplea para la identificación

del virión o para el diagnóstico de la infección, es la prueba de neutralización en cultivo de tejidos (15,22). El virus aislado puede ser identificado demostrando la habilidad del antisuero contra EV-70 para neutralizar la capacidad infectiva del virus, ya sea previniendo el efecto citopático, la producción de placas u otras manifestaciones de infección en cultivos celulares. La infección puede ser diagnosticada por un incremento significativo en los anticuerpos neutralizantes producidos por el Enterovirus 70 entre la fase aguda y la convaleciente - de la enfermedad, se considera que un aumento al cuádruple entre los títulos de anticuerpos es de valor diagnóstico para una infección por el virus de la CHA (1,20,24), un título de anticuerpos neutralizantes 1:16 es el nivel diagnóstico crítico de CHA (1,16,17,22) y título 1:8 de anticuerpos neutralizantes es el nivel más bajo indicativo de una pasada exposición al virus de la CHA (17,22). El título más elevado que se ha reportado es 1:1 024 (17) y se ha asociado un título de 1:512 a pacientes con complicación neurológica (16).

AISLAMIENTO DEL VIRUS

Hay evidencias de que la conjuntiva no es el único habitat del EV-70, pues se ha logrado cultivar también a partir de lavados faríngeos y de heces fecales (7), la posibilidad de aislamiento del virus es mayor en las muestras conjuntivales de los pacientes que tienen más o menos 24 horas de presentar los síntomas de la enfermedad (20). Se ha confirmado que la conjuntiva es el primer sitio de infección y multiplicación y que la fre -

cuencia de los síntomas sistémicos es menos significativa clínicamente, que la evidente enfermedad ocular (7, 23,24).

EPIDEMIOLOGIA

Los factores climáticos son de gran importancia en la epidemiología de la CHA, la mayoría de las epidemias se han localizado entre los 35° latitud norte y 10° latitud sur (Mapa I)(7), en ciudades de clima caliente (27° a 43°C) y de humedad elevada con promedio anual de lluvias de 1 020 a 6 100 mm. Asimismo, los lugares donde se ha dado un inicio explosivo y un desarrollo pandémico han sido áreas costeras tropicales, densamente pobladas, con condiciones higiénicas no favorables.

Se ha visto que la CHA ha afectado mayormente a adultos jóvenes (≥ 10 años) (14,15,22,24) y con menor frecuencia a la población infantil (17,22), observaciones muy circunstanciales y dependientes de las costumbres sociales (7), pues también se considera en algunos lugares al grupo de edad de 5 a 14 años como la población de alto riesgo a este padecimiento (28). Las infecciones subclínicas o inaparentes son más comunes en la población infantil (14,17).

Todo grupo étnico y clase social tiene la probabilidad de infectarse con CHA, favoreciendo a la extensión de la enfermedad las clases socioeconómicas bajas.

La conjuntivitis hemorrágica aguda es altamente contagiosa transmitiéndose generalmente por contacto directo con la secreción conjuntival a través de manos-ojos (3,4,14), justamente antes del principio de la enfermedad, en la etapa catarral aguda

del padecimiento (primeras 24 horas (11) y durante el período de la enfermedad activa. La infección puede transmitirse también a través de instrumentos médicos contaminados (14), toallas (4,17), anteojos, pañuelos, goteros y cualquier otro objeto que se ponga en contacto con el ojo enfermo (11).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue realizar una encuesta serológica de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en comunidades fronterizas de Chiapas, con el fin de conocer el estado de inmunidad comunitaria en anticuerpos neutralizantes contra EV-70.

MATERIAL Y METODOS

AREA GEOGRAFICA ESTUDIADA

El presente estudio se realizó a lo largo de la frontera sur de México con Guatemala (Chiapas). Chiapas limita al noroeste con Guatemala, al sur con el pacífico, al oeste con el estado de Oaxaca, al norte con el de Tabasco, su clima es tropical y templado con lluvias abundantes.

El área estudiada comprendió desde la zona de Márquez de Comilla hacia el este hasta la de Trinitaria al oeste. El área fue dividida en tres zonas: la zona I abarcó Trinitaria hasta Lagos de Montebello, con clima templado y es la de mayor desarrollo económico; zona II Margaritas, de clima tropical selvático y escaso desarrollo económico y la zona III Márquez de Comillas de clima tropical selvático y un buen desarrollo económico (Mapa 2).

En la zona I se seleccionaron 4 campamentos guatemaltecos: Santa Rosa, Chupadero, Carmen Xhan y Colonia Cuauhtémoc. En la zona II, dos campamentos: Flor de Café y Las Ventanas y también dos campamentos en la zona III: Pico de Oro y Benemérito de las Américas.

En cada zona se seleccionó una comunidad mexicana representativa, en la zona I Las Delicias, en la zona II Flor de Café y en la III Pico de Oro.

COLECCION DE MUESTRAS

Se estudiaron un total de 266 familias, seleccionadas por un muestreo aleatorio simple, tomando como marco de muestreo el

CAMPAMENTOS

- 1-SANTA ROSA
- 2-EL CHUPADERO
- 3-CARMEN KHAN
- 4-COLONIA CUAUTEMOC
- 5-FLOR DE CAFE
- 6-LAS VENTANAS
- 7-PICO DE ORO
- 8-BENEMERITO DE LAS AMERICAS

COMUNIDADES MEXICANAS

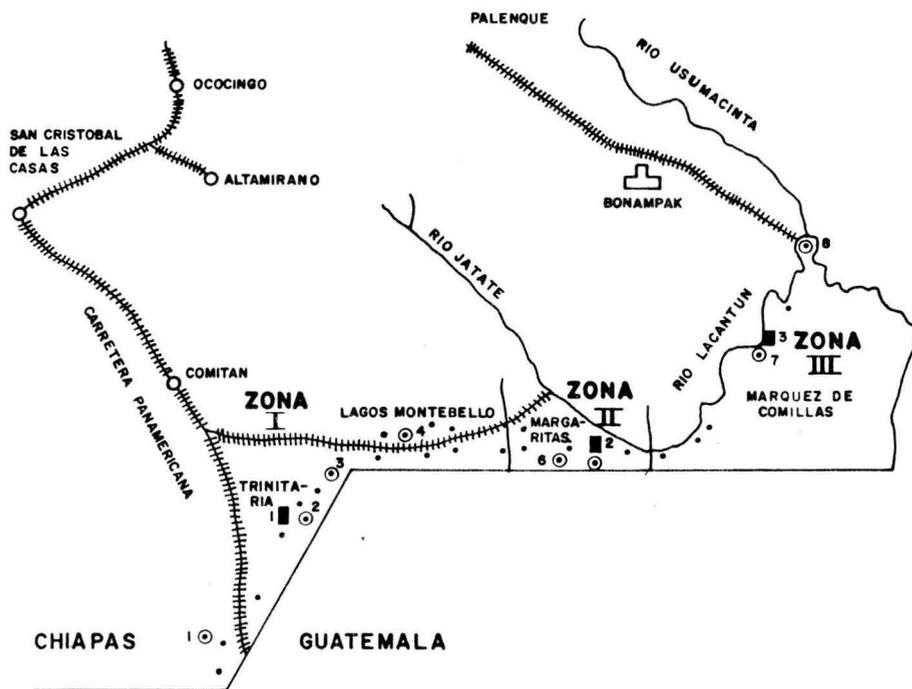
- 1-LAS DELICIAS
- 2-FLOR DE CAFE
- 3-PICO DE ORO

SIMBOLOGIA

- FRONTERA
- ~ RIO
- ▤ CARRETERA
- CAMPAMENTOS
- ⊙ CAMPAMENTOS EN ESTUDIO
- ▬ COMUNIDADES MEXICANAS

MAPA.- 2

CAMPAMENTOS DE REFUGIADOS GUATEMALTECOS Y COMUNIDADES MEXICANAS DEL ESTADO DE CHIAPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO



listado de familias existentes en cada campamento analizado.

La recolección de muestras y datos (sexo, edad, parentesco, lugar de origen, tiempo de residencia en el campamento y hábitos migratorios) se hizo mediante visita domiciliaria por médico y técnicos de laboratorio del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) - Facultad de Medicina (UNAM) en septiembre de 1983.

Las muestras fueron conservadas a temperatura de -70°C en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional IMSS, realizándose la determinación de anticuerpos contra EV-70 desde octubre de 1984 a septiembre de 1985.

Se trabajaron un total de 1 406 sueros; todos de individuos sin diagnóstico clínico de conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA) perteneciendo 872 a comunidades guatemaltecas y 534 a comunidades mexicanas.

TIEMPO DE RESIDENCIA DE LOS CAMPAMENTOS

Los ocho campamentos de guatemaltecos eran todos de reciente fundación, de tal manera que sus habitantes tenían un tiempo promedio de residencia en ellos de 14 meses, correspondiendo al campamento Cuauhtémoc un tiempo máximo de 16 meses y a Santa Rosa el tiempo mínimo de 8 meses de residencia promedio.

En contraste a los campamentos de mexicanos correspondió un tiempo promedio de residencia de 6, 15 y 19 años para Flor de Café, Pico de Oro y Delicias respectivamente, resultando 17 años como promedio general (Cuadro 1).

CUADRO.- I**TIEMPO DE RESIDENCIA DE LOS CAMPAMENTOS**

CAMPAMENTOS GUATEMALTECOS	Σ MESES / HABITANTES	PROMEDIO (años)
FLOR DE CAFE	2 656 / 162	16.4
LAS VENTANAS	1 082 / 72	15.0
CHUPADERO	1 620 / 119	13.6
SANTA ROSA	295 / 36	8.2
CARMEN XHAN	390 / 34	11.5
BENEMERITO	2 313 / 194	11.9
PICO DE ORO	1 720 / 118	14.6
CUAUHTEMOC	1 578 / 100	15.8
PROMEDIO GRAL.	11 796 / 835	14.0

CAMPAMENTOS MEXICANOS	Σ AÑOS / HABITANTES	PROMEDIO (años)
DELICIAS	4 412 / 228	19.35
FLOR DE CAFE	138 / 22	6.27
PICO DE ORO	1 675 / 112	14.95
PROMEDIO GRAL.	6 225 / 362	17.2

DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO

La distribución de la población en estudio reveló tanto en guatemaltecos como en mexicanos una estructura de edad similar con una mayor frecuencia de individuos en el rango de 0 a 19 años (Figura 1).

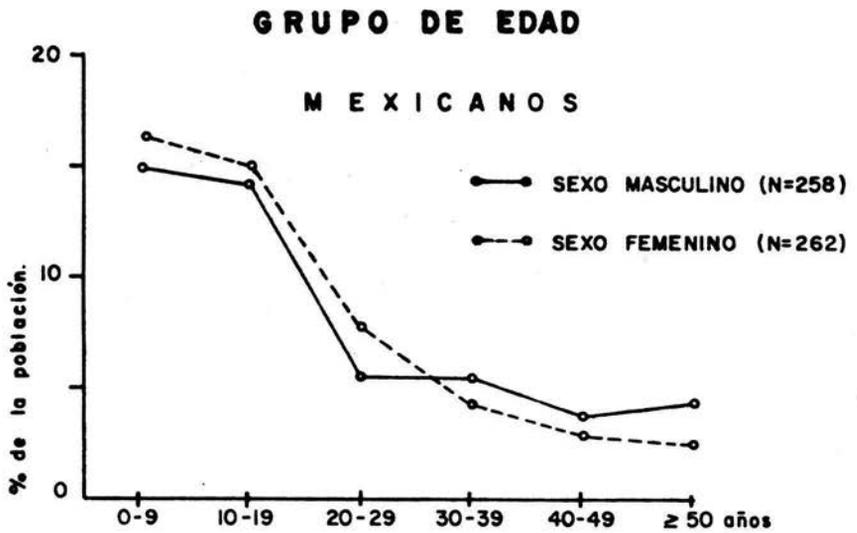
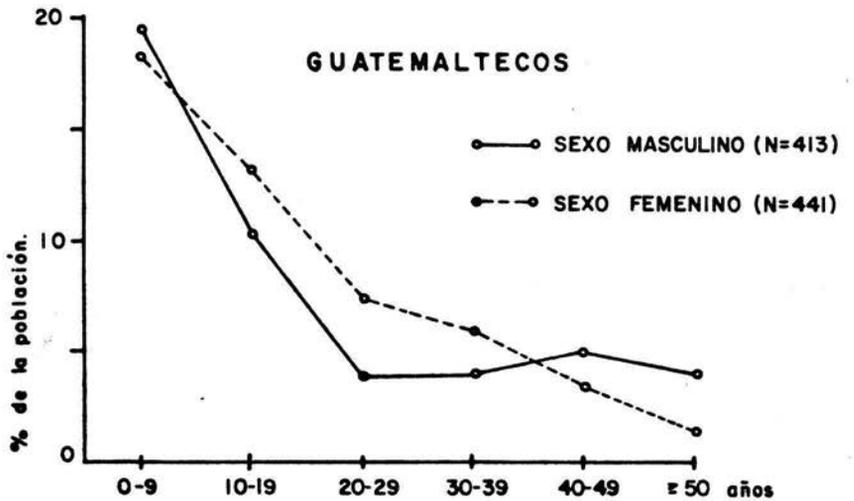
La relación existente entre el sexo masculino/femenino señala una mayor proporción del sexo femenino en campamentos guatemaltecos, correspondiendo un total de 441 individuos al sexo femenino (50.5% de la población guatemalteca estudiada) y 413 (47.4%) al sexo masculino, observándose en el intervalo de 10 a 39 años mayor densidad del sexo femenino (Figura 1). En los campamentos mexicanos no existe diferencia en el número de individuos del sexo femenino y sexo masculino, se registraron 262 individuos con sexo femenino y 258 con sexo masculino (49% y 48% respectivamente), aunque en su estructura por edades se observa una mayor proporción del sexo femenino en el intervalo de edad de 0 a 29 años (Figura 1).

CULTIVO CELULAR

Se usaron células MRC-5, las cuales son una línea diploide de fibroblastos de pulmón de embrión humano. El cultivo se realizó en botellas de plástico y en microplacas de 96 pozos de fondo plano empleando Medio Diploide de Eagle y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) para el medio de crecimiento ó 2% SFB para el medio de mantenimiento, adicionado de penicilina 100U/ml y estreptomomicina 100 µg/ml. El medio utilizado en las microplacas contenía además HEPES (ácido N-2 hidroxietilpiperazina N'-2 eta

FIGURA I

DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO DE LOS HABITANTES ESTUDIADOS DE CAMPAMENTOS FRONTERIZOS EN CHIAPAS



GRUPO DE EDAD

nosulfónico) 25mM como amortiguador.

PROCESAMIENTO DE SUEROS

Los sueros fueron tratados con antibióticos y a temperatura elevada con el fin de eliminar bacterias e inactivar el complemento, para esto se diluyeron los sueros 1:8 en Medio Diploide con 250 µg de estreptomycin, 250 U de penicilina y HEPES 25 mM, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y fueron inactivados a 56°C en baño María por media hora.

Estos sueros procesados se conservaron a -20°C hasta su utilización en la prueba de microneutralización.

SUEROS DE REFERENCIA

El suero control positivo a CHA fue obtenido de un caso positivo de la epidemia de Cancún en 1981.

El suero negativo se obtuvo de un sujeto sano sin antecedentes previos de conjuntivitis hemorrágica.

VIRUS

Se usó como referencia el Enterovirus 70 cepa Kono J670/71.

Para la producción de EV-70 se infectaron monocapas con -fluentes de células MRC-5 (29) eliminando el medio y agregando 0.2 ml de EV-70 (Enterovirus 70) e incubando a 33°C (25) durante media hora con agitación a intervalos de 10 minutos. Después de este período de incubación se le agregó nuevamente Medio Diploide al 2% de SFB, se incubó a 33°C hasta que el efecto citopático (ECP) fue completo (generalmente después de 24 horas)

(23) y se congeló-descongeló repetidas veces con el propósito de romper las células y asegurar la liberación completa de los virus al medio.

TITULACION DEL VIRUS

Para obtener el valor de I Dosis Infecciosa del 50% en Cultivos de Tejidos (DICT_{50%}) se hicieron diluciones seriadas 1:10 del virus producido (10^{-1} a 10^{-6}), se inocularon 50 μ l de cada dilución en dos pozos de la microplaca con monocapa de células MRC-5 y después se incubó a 33°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se registró la lectura al microscopio de luz a las 48 horas, se determinó el título en DICT_{50%} por el Método de Kurber (18) y por último se realizó el cálculo de las 100 DICT_{50%} en 12.5 μ l, volumen utilizado para las inoculaciones posteriores.

PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACION

La prueba de microneutralización con virus de la CHA se llevó a cabo en microplacas con monocapa confluyente de células MRC-5.

Se hizo una mezcla con 0.1 ml. del suero problema procesado y 0.1 ml del virus conteniendo 100 DICT_{50%}/12.5 μ l y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente (23).

Después de la incubación se eliminó el medio de crecimiento de la microplaca confluyente de células MRC-5 y se añadieron 150 μ l de medio de mantenimiento a cada uno de los pozos. Se inculó con 25 μ l de la mezcla virus-suero y como control de cada caso se inculó un pozo con únicamente 12.5 μ l de la dilu-

ción del suero respectivo, con objeto de valorar la posible toxicidad inducida por el suero.

En cada microplaca se probaron 36 sueros y se incluyeron controles de virus y de los sueros positivo y negativo al virus de la conjuntivitis hemorrágica aguda. Los controles de virus abarcaron seis pares de pozos, cada par inoculado con 12.5 μ l de virus con: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 DICT₅₀% y sin virus. Los controles de suero positivo y negativo se trabajaron a las diluciones de 1:4, 1:16 y sin suero, realizando la mezcla virus - suero igual que en los sueros problema e inoculándose por duplicado con 25 μ l en cada pozo.

Las microplacas inoculadas se incubaron a 33°C con atmósfera de CO₂ al 5%. Se observó la presencia o ausencia de efecto citopático utilizando el microscopio invertido, obteniendo la primera lectura a las 24 horas y la última a las 48 horas, tiempo en que se diferencia claramente el efecto citopático en las células infectadas.

Se seleccionaron los sueros positivos (sueros en donde no se registró efecto citopático a las 48 horas usando la dilución 1:8). A éstos se les aplicó nuevamente la prueba de microneutralización para obtener el título de anticuerpos neutralizantes, usando las diluciones 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64.

RESULTADOS

SEROPOSITIVIDAD A EV-70 POR CAMPAMENTO

De los 1 406 individuos que formaron nuestra población solo 84 casos tuvieron un título igual o superior a 1:8 por la prueba de neutralización contra EV-70, correspondiendo a un 5.9% de seropositividad. De los 872 individuos integrantes de los ocho campamentos de guatemaltecos 33 (3.8%) fueron seropositivos, sin desviaciones importantes de este valor promedio entre los distintos campamentos (Cuadro 2). En cambio para los tres campamentos de mexicanos se obtuvo un 9.6% de seropositividad, 51 de los 534 sueros estudiados tuvieron un título mayor o igual a 1:8 y esta diferencia es aportada solo por el campamento Pico de Oro, como se aprecia en el cuadro 2; este campamento difiere significativamente de los otros dos de mexicanos en la incidencia de seropositividad o del conjunto de campamentos de guatemaltecos (prueba χ^2 con $p = 0.001$).

TITULOS DE LOS SEROPOSITIVOS

Los títulos de los seropositivos mexicanos o guatemaltecos fueron siempre bajos (Figura 2) y correspondieron en su mayoría al valor de corte de 1:8 y solo un caso, al valor máximo de 1:64; este patrón de títulos bajos es congruente con la baja respuesta de anticuerpos circulantes que se espera de una infección localizada y con lo reportado por otros autores (6,16,17,20,22). En la figura 2 se observa que el porcentaje de seropositividad es mayor en mexicanos.

CUADRO 2

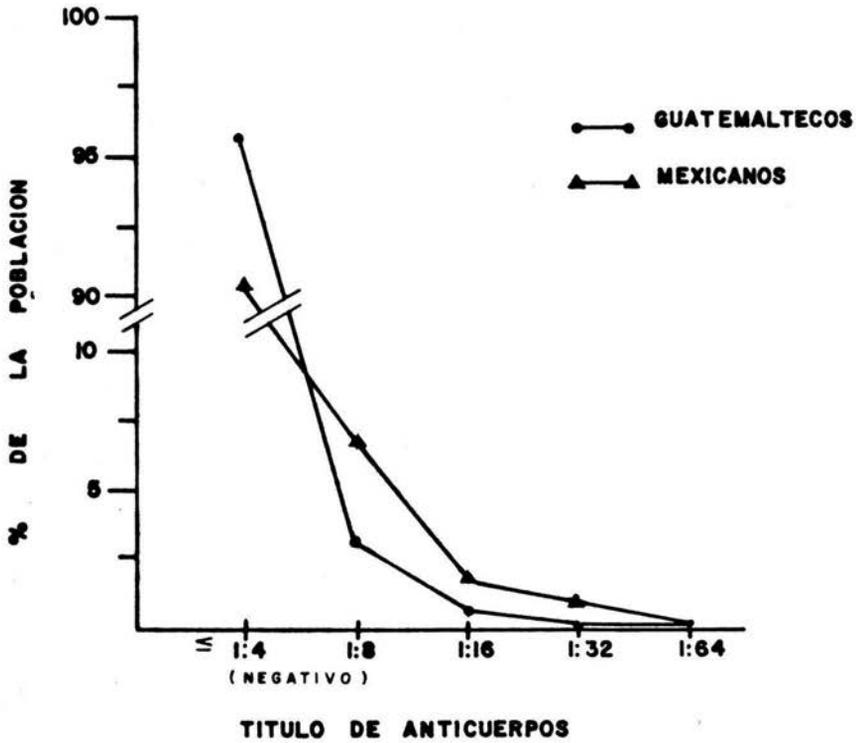
SEROPOSITIVIDAD A EV-70 POR CAMPAMENTO

CAMPAMENTOS GUATEMALTECOS	No. INDIVIDUOS	No. POSITIVOS	% POSITIVIDAD
FLOR DE CAFE	169	3	1.8
LAS VENTANAS	72	3	4.2
CHUPADERO	136	8	5.9
SANTA ROSA	36	0	0
CARMEN XHAN	43	0	0
BENEMERITO	198	8	4.0
PICO DE ORO	118	3	2.5
CUAUHTEMOC	100	8	8.0
T O T A L .	872	33	3.8

CAMPAMENTOS MEXICANOS	No. INDIVIDUOS	No. POSITIVOS	% POSITIVIDAD
DELICIAS	228	6	2.6
FLOR DE CAFE	22	1	4.5
PICO DE ORO	284	44	15.5
T O T A L .	534	51	9.6

FIGURA-2

**TITULOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES
CONTRA EV-70**



DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO DE LOS SEROPOSITIVOS

Al calcular el porcentaje de seropositividad entre los refugiados guatemaltecos para los distintos grupos de edad y sexo se observa que no hay seropositivos menores de tres años de edad (Figura 3) y que existen diferencias entre los distintos grupos de edad, ya que los niños y adolescentes (menores de 19 años) muestran una incidencia menor que los adultos, excepto por el grupo de adultos entre 30 y 39 años.

Por otro lado los campamentos de mexicanos coinciden con los guatemaltecos en que no hay ningún seropositivo menor de tres años (Figura 4), pero a diferencia de estos últimos, no muestran predominio de ningún grupo de edad (entre los mayores de tres años) con respecto al porcentaje de seropositividad.

Con respecto al sexo entre los campamentos de mexicanos solo se observa un predominio en la incidencia para el sexo femenino entre los adultos mayores de 40 años y no se observa un patrón claro entre los guatemaltecos.

INFECCION INTRAFAMILIAR

Los 51 seropositivos mexicanos pertenecía a 25 familias, del mismo modo que los 33 seropositivos guatemaltecos pertenecían también a 25 familias; con un mayor promedio de individuos seropositivos por familia entre los mexicanos, como se ilustra en la Figura 5.

LUGAR DE ORIGEN

No se encontró diferencia en el porcentaje de seropositi -

FIGURA 3

**PORCENTAJE DE SEROPOSITIVIDAD CONTRA EV-70
DE ACUERDO A EDAD Y SEXO EN COMUNIDADES
DE GUATEMALTECOS EN CHIAPAS**

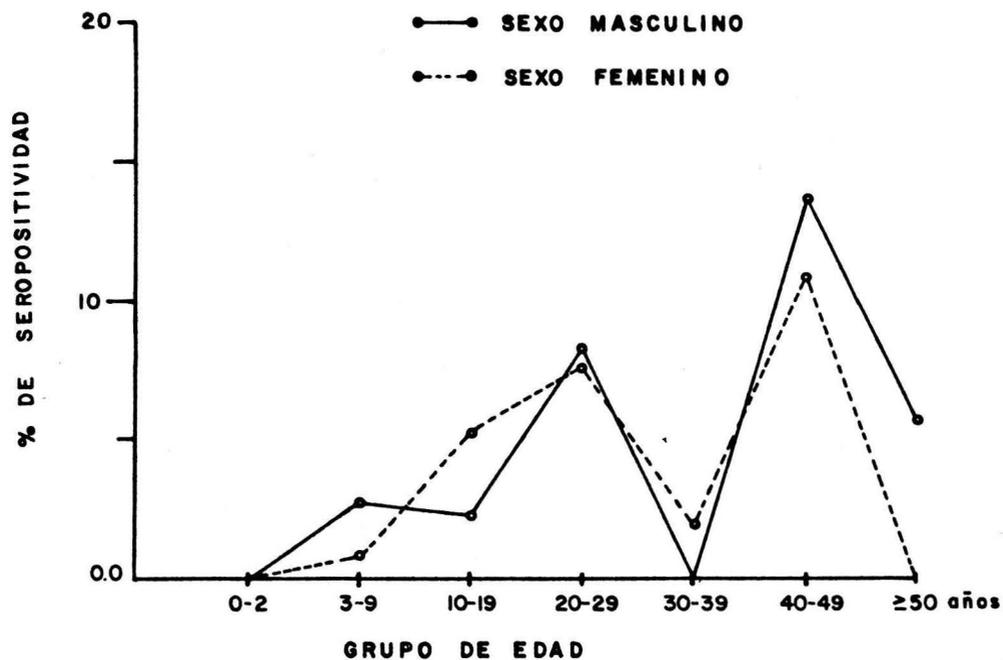


FIGURA 4

**PORCENTAJE DE SEROPOSITIVIDAD CONTRA EV-70
DE ACUERDO A EDAD Y SEXO EN COMUNIDADES
DE MEXICANOS EN CHIAPAS**

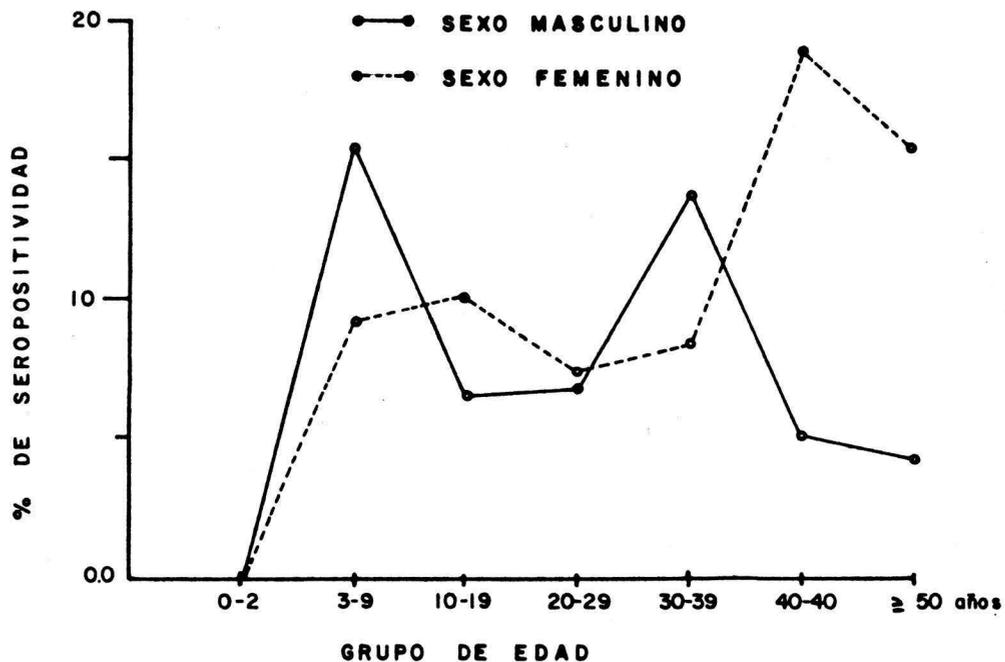
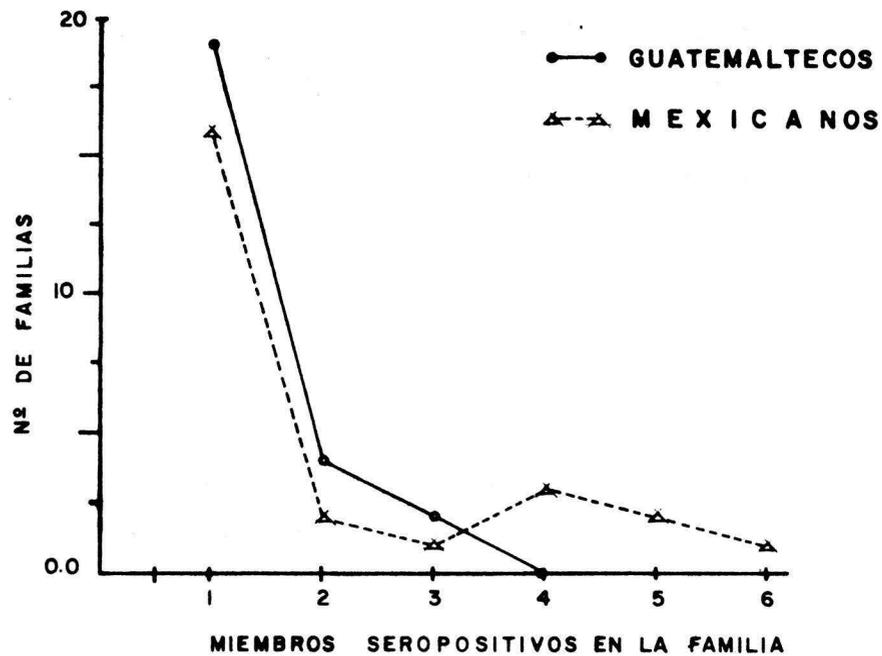


FIGURA 5
INFECCION INTRAFAMILIAR CON
EV-70 EN COMUNIDADES DE CHIAPAS



vidad de acuerdo al lugar de origen, como muestra el Cuadro 3.

Los individuos seropositivos de los campamentos mexicanos eran originarios de los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa, Tabasco, Tlaxcala y Veracruz; estados en donde se reportó brotes de CHA durante 1981-82 (11,12) Cuadro 4.

MIGRACION

Al estudiar los hábitos migratorios (correspondientes a 1983) observamos que casi todas las familias integrantes del campamento Pico de Oro migraban temporalmente y al compararlas con los otros campamentos, además de migrar más lo hacían por más tiempo (Cuadro 5). Por otro lado, los eventos migratorios registrados para el campamento Pico de Oro indican que en la mayoría de los casos (45 de 51) migraba la familia entera, mientras que de las ocho familias de Delicias que registraban eventos migratorios, solo en un caso migró toda la familia, Además las migraciones generalmente se realizaban al estado del cual provenían.

CUADRO.- 3

LUGAR DE ORIGEN DE LOS HABITANTES DE LAS COMUNIDADES GUATEMALTECAS

DEPARTAMENTO	No. ESTUDIADO	No. POSITIVOS	% POSITIVIDAD
CHIMALTENANGO	7		
CHIQUMULA	18	2	11.1
ESCUINTLA	14		
GUATEMALA	2		
HUEHUETENANGO	550	22	4.0
IZABAL	11		
JALAPA	12		
JUTIAPA	4		
EL PETEN	97	4	4.1
QUETZALTENANGO	3		
EL QUICHE	53		
RETALHUELEN	1		
SACATEPEQUEZ	1		
SAN MARCOS	12		
SANTA ROSA	23	2	8.7
SUCHITEPEQUEZ	19	2	10.5
BAJA VERAPAZ	4		
ZACAPA	10		
SIN DATOS	31	1	3.2
TOTAL.	672	33	3.8

CUADRO.- 4

LUGAR DE ORIGEN DE LAS COMUNIDADES MEXICANAS

ESTADO	No. ESTUDIADO	No. POSITIVOS	% de POSITIVIDAD
COLIMA	8	0	
CHIA PAS	340	21	6.2
DISTRITO FEDERAL	1	0	
GUERRERO	25	7	28.0
MICHOACAN	7	1	14.3
OAXACA	33	6	18.2
SINALOA	3	1	33.3
SONORA	1	0	
TABASCO	20	3	15.0
TLAXCALA	6	1	16.7
VERACRUZ	35	5	14.2
SIN DATOS	55	6	10.9
TOTAL	534	51	9.6

CUADRO.- 5

HABITOS MIGRATORIOS ENTRE LAS FAMILIAS DE LOS CAMPAMENTOS MEXICANOS.

CAMPAMENTO	FAMILIAS ESTUDIADAS	FAMILIAS QUE MIGRAN*	TIEMPO PROMEDIO (meses)
DELICIAS	45	8	1
FLOR DE CAFE	8	0	
PICO DE ORO	54	51	6

* SE INCLUYE COMO FAMILIAS QUE MIGRAN AQUELLAS EN QUE AL MENOS UN INTEGRANTE MIGRA .

DISCUSION

Un aspecto fundamental para la realización del presente estudio fue la estandarización de la prueba de microneutralización en el laboratorio, siendo esta prueba altamente específica y sensible (8) ya que permite discriminar entre los anticuerpos de diferentes serotipos y descubrir pequeñas cantidades de ellos; es sin embargo una prueba que requiere un tiempo relativamente largo para llevarse a cabo (entre 7-10 días desde que se siembra una microplaca) y solo puede hacerse en laboratorios especializados en Virología, por los requerimientos de condiciones estériles, reactivos biológicos especializados y seguridad en el manejo de virus.

En este tipo de estudio la lectura del efecto citopático se realiza generalmente de 4 a 7 días postinfección (8,17) aunque Hierholtzer (1984) y nosotros observamos que el efecto citopático en cultivo de tejidos por EV-70 es claramente visible a las 48 horas.

Al comparar el porcentaje de seropositividad obtenido con los porcentajes de infección de la población registrados previamente en varias partes del mundo; los cuales van del 4.7% a más del 40% de la población (4), el valor obtenido por nosotros (5.9%) queda ubicado en el límite inferior. Este dato es explicable primeramente en base a dos factores: la baja densidad de población y los movimientos migratorios.

Comparando los resultados de esta encuesta serológica entre campamentos mexicanos y guatemaltecos se observa un mayor por ciento de seropositividad en las comunidades mexicanas

(9.6%) que en las guatemaltecas (3.8%) (Cuadro 2). Presentándose en las comunidades de mexicanos diferencias notables en el por ciento de seropositividad entre los campamentos, específicamente en Pico de Oro (15.5% de seropositividad). No hay diferencias importantes entre los campamentos guatemaltecos.

La mayoría de los títulos seropositivos correspondieron al valor de corte 1:8; nivel más bajo indicativo de una pasada exposición al virus de la CHA (17,24). Las posibles causas del registro de bajos títulos de anticuerpos a Enterovirus 70 pueden estar relacionadas con: 1) Una inmunidad no duradera (7), 2) la baja respuesta de anticuerpos circulantes que se espera de una infección localizada y 3) baja incidencia de la enfermedad en Chiapas (11,12) y Guatemala durante 1981-83.

Por lo anteriormente mencionado decimos que la CHA en 1983 no era un problema (situación prevista anteriormente por la ausencia de casos clínicos), sin embargo es indicativo de que tanto los mexicanos como los guatemaltecos han estado alguna vez en contacto con el Enterovirus 70. Por antecedentes históricos del padecimiento se sabe que en 1981 tanto Chiapas como Guatemala presentaron brotes de CHA (2,11,21).

Una situación común en ambas comunidades (guatemaltecos-mexicanos) es la ausencia de seropositivos menores de tres años lo cual implica que la población no ha estado en contacto con el EV-70, durante este tiempo.

En las comunidades guatemaltecas el grupo de edad mayormente afectado por la CHA es el de 40-49 años. En general en los guatemaltecos hay una mayor incidencia de seropositivos en los

adultos y en los mexicanos no hay un patrón claro de distribución por edad, ya que tienen un por ciento de seropositividad semejante entre los grupos de 3-9, 20-29 y 40-49.

Debido a que ninguno de los campamentos de guatemaltecos había sido fundado durante la epidemia de CHA de 1981, se quiso saber si existía un lugar de origen preferente entre los guatemaltecos seropositivos a EV-70, pero, no se encontraron diferencias en el porcentaje de seropositividad de acuerdo al lugar de origen, no pudiendo ubicar de esta forma el posible foco de infección entre los distintos departamentos de Guatemala.

Se pensó que en los campamentos mexicanos existía cierta relación entre lugar de origen y seropositividad a EV-70 (Cuadro 4). Esta primera impresión fue errónea, pues como se mencionó anteriormente, el tiempo de residencia promedio general de los campamentos mexicanos fue de 17 años y la epidemia de CHA se registró en nuestro país dos años antes de la toma de muestras, lo cual implica que la infección se suscitó en el Estado de Chiapas o durante la migración de la familia a otros Estados.

Se notó un claro impacto de los hábitos migratorios en la incidencia de seropositivos, en la que el único campamento (Pico de Oro) en el que sus integrantes migraban temporalmente por tiempo relativamente largo a diversos Estados de la República Mexicana tuvieron un porcentaje de seropositividad mayor que los otros; siendo claro que este comportamiento solo puede originarse en base a una tasa de incidencia diferente entre Guatemala y México. Esta manera particular de adquirir la infección durante la migración temporal, es la probable causa de una dis-

tribución "familiar" de la infección, en la que no hay diferencias importantes en incidencia entre los distintos grupos de edad, como se ha observado generalmente, sino que son afectados varios miembros de una familia cuando éstas migran a los focos de infección en donde se dan las características para una amplia diseminación del virus.

CONCLUSIONES

1.- Las comunidades guatemaltecas y mexicanas estudiadas ya han estado en contacto con EV-70 (por evidencia serológica).

2.- Los seropositivos corresponden a un porcentaje bajo de la población estudiada, concluyendo que la CHA no era un problema en la frontera sur de México hasta 1983.

3.- No hubo ningún seropositivo menor de tres años, por lo que probablemente los individuos seropositivos fueron infectados durante 1981-82.

4.- Existe un por ciento de seropositividad mayor en los mexicanos que en los guatemaltecos, indicativo de una incidencia de conjuntivitis hemorrágica aguda diferente entre las poblaciones fronterizas de Guatemala y México.

5.- Hay una mayor infección intrafamiliar entre los mexicanos que en los guatemaltecos estudiados, siendo la migración un factor importante en la adquisición del padecimiento.

6.- Debido a que un porcentaje bajo de la población estudiada presentó anticuerpos neutralizantes se infiere que ésta es altamente susceptible a la conjuntivitis hemorrágica aguda, situación que debe ser considerada para tomar las precauciones debidas en caso de que se presente algún foco de infección.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez-Muñoz, M.T., Guiscafré-Gallardo, J.P. y Ruíz-Gómez, J.: Investigación de la Etiología del Brote de Conjuntivitis Hemorrágica en la Ciudad de Cancún (México). Arch Invest Méd (Méx) 1984; 15: 79-87.
- 2.- Center for Disease Control.: Acute Hemorrhagic Conjunctivitis-Key West, Florida. MMWR 1981; 30: 463-64.
- 3.- Center for Disease Control.: Acute Hemorrhagic Conjunctivitis-Panama and Belize, 1981. MMWR 1981; 30: 497-500.
- 4.- Communicable Disease Surveillance Centre.: Epidemiology - Acute Haemorrhagic Conjunctivitis. British Medical Journal 1982; 248: 833-34.
- 5.- Décimo Censo General de Población y Vivienda. Instituto Nacional Estadística, Geografía e Informática. México 1984.
- 6.- Fenner, F. and White, O.D.: Virología Médica. Segunda Edición. Prensa Médica Mexicana, S.A. 1981.
- 7.- Hierholzer, K.C., Hilliard, K.A., and Esposito, J.J.: Sero-survey for "Acute Hemorrhagic Conjunctivitis" Virus (Enterovirus 70) Antibodies in the Southeastern United States, with Review of the Literature and some Epidemiologic Implications. Am J Epidemiol 1975; 102: 533,44.
- 8.- Hierholzer, P.G., Bigham, P.G., Cooms, R.A., Stone, Y.O., - and Hatch, M.H.: Quantitation of Enterovirus 70 Antibody by Microneutralization Test and Comparison with Standard Neutralization, Hemagglutination Inhibition, and Complement Fixation Test with Different Virus Strains. J Clin Microbiol 1984; 19: 826-30.

- 9.- Higgins, P. G., Scott, R. K., Davies, M.P., and Gamble, D. R., : A Comparative Study of Viruses Associated with Acute Haemorrhagic Conjunctivitis. J Clin Path 1972;27:292-96.

- 10.-Instituto Mexicano del Seguro Social. Boletín Epidemiológico Anual 1980: 11.

- 11.-Instituto Mexicano del Seguro Social. Boletín Epidemiológico Semanal 1983; 52.

- 12.-Instituto Mexicano del Seguro Social. Comentarios al Boletín Epidemiológico Semanal 1982; 52.

- 13.-Instituto Mexicano del Seguro Social. Comentarios al Boletín Epidemiológico Semanal 1984; 52.

- 14.-Kono, R.,: Apolo 11 Disease or Acute Hemorrhagic Conjunctivitis: A Pandemic of a New Enterovirus Infection of the Eyes. Am J Epidemiol 1975; 101: 383-90.

- 15.-Kono, R., Miyamura, L., Yamazako, S., Sasagawa, A., Kuiahas hi, H., Tajiri, E., Takeda, N., Robin, Y., Renaudet, J.: Seroepidemiologic Studies of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis Virus (Enterovirus Type 70) in West Africa. II. Studies with Human Sera Collected in West African Countries other than Ghana. Am J Epidemiol 1981; 114: 274-83.

- 16.-Kono, R., Sasawa, A., Iskoo, K., Sugiura, S., Ochi, M., Matsumiya, H., Uchida, Y., Kameyama, K., Kaneko, M., and Sakurari, N. : Pandemic of New Type of Conjunctivitis. Lancet 1972; 1: 1191-97.

- 17.-Kono, R., Sasawa, A., Miyamura, K., and Tajiri, E.: Serologic Characterization and Sero-epidemiologic Studies on Acute Hemorrhagic Conjunctivitis (AHC) Virus. Am J Epidemiol 1975; 101: 444-57.

- 18.-Lennette, E. H. and Schidt, N. J.: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. 4a. Edición. American Public Health Association, Nueva York, 1969.
- 19.-Lowalekar, K. B., Singh, V. D., and Agrawal, R. L.,: Report on an Epidemic of Polio-like Neuroparalytic Disease Associated with Acute Haemorrhagic Conjunctivitis (A.H.C.). JAPI 1983; 31: 339-42.
- 20.-Malison, M. D., Gunn, R. A., Hatch, M. H., Bernard, K. E., and White, M. C., : Acute Hemorrhagic Conjunctivitis, Key West, Florida. Am J Epidemiol 1984; 120: 717-26.
- 21.-Melnick, J. L., : Progress in Medical Virology Vol. 29 Karger, E. U. (Texas) 1984 : 23-38.
- 22.-Minami, K., Otatsune, S., Mingle, J. A., Aoakwa, S. M., Quarcoopome, C. O., Lono, L., Uchida, Y., Kurahashi, H., and Kono, R. : Seroepidemiologic Studies of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis Virus (Enterovirus Type 70) in West Africa. I. Studies with Human Sera from Ghana Collected Eight Years after the First Outbreak. Am J Epidemiol 1981; 114: 267-73.
- 23.-Mirkovic, R. R., Kono, R., Yin-Murphy, M., Shier, R., and Schmidt, N. J.,: Enterovirus Type 70: The Etiologic Agent of Pandemic Acute Haemorrhagic Conjunctivitis. Bull Wld Hlth Org 1973; 49: 341-46.
- 24.-Sklar, V. E., Patriarca, P. A., Onorato, I. M., Langford, M. P., Clark, S. W., Culbertson, W.W., and Forster, R. K.,: Clinical Findings and Results of Treatment in an Outbreak of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Southern Florida. Am J Ophthalmol 1983; 95: 45-54.
- 25.-Takeda, N., Miyamura, K., Kono, R., and Yamazako, S.: Characterization of a Temperature-Sensitive Defect of Enterovirus Type 70. J Virol 1982; 44: 98-106.

- 26.-Wadia, N. H., Wadia, N. P., Katrak, S. M., and Misra, V.P.,: Neurological Manifestations of Acute Haemorrhagic Conjunctivitis. Lancet 1981; 2: 529-30.
- 27.-Waterman, S. H., Casas-Bernabe, R., Hatch, M. H., Bailey, R. E., Jiménez, M. R., Ramírez, R. R., and Bigas, R. M. : Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Puerto Rico, 1981-1982. Am J Epidemiol 1984; 120: 395- 403.
- 28.-World Health Organization: Acute Haemorrhagic Conjunctivitis Wkly Epidem Rec 1982; 2: 10.
- 29.-World Health Organization: Enterovirus Surveillance "Laboratory Isolation of Enterovirus 70". Wkly Epidem Rec 1981; 50: 396.