

ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA ENFERMEDAD ENTRE 1962 y 1971, EN LA GUAJIRA VENEZOLANA.

Slavia Ryder*

| | |
|---|------------|
| INTRODUCCION | 92 |
| HISTORIA | 93 |
| ETIOLOGIA | 97 |
| REPLICACION DEL VIRUS | 100 |
| PATOGENIA | 101 |
| CUADRO CLINICO | 103 |
| DIAGNOSTICO DE LABORATORIO | 107 |
| EPIDEMIOLOGIA | 109 |
| Vectores | 109 |
| Animales salvajes | 112 |
| Animales domésticos | 113 |
| Aves | 114 |
| Humanos | 114 |
| Experiencias en Venezuela | 115 |
| CONTROL | 125 |
| RESUMENES | 127 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 129 |

* Instituto de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela.

INTRODUCCION

Las enfermedades causadas por virus han sido siempre un reto al médico práctico y al de laboratorio. Si bien la experiencia dicta pautas muchas veces, los más variados síndromes pueden ser causados por un mismo agente, y viceversa; y al final nos conformamos con el término genérico de "virosis".

Pero cuando estas enfermedades se convierten en problema de salud pública, porque aparecen en forma de brotes periódicos, por su alta morbilidad, por su compleja ecología que no sólo comprende al hombre, entonces el individuo de laboratorio debe agudizar su ingenio para aclarar las circunstancias que envuelven su supervivencia en el medio ambiente.

La encefalitis equina venezolana tiene un poco de todo ésto. Al comienzo, allá por los años 30, se creía que sólo afectaba a los equinos. Enseguida se obtuvo evidencia de que ocasionaba enfermedad al hombre, pero leve. Su modo de transmisión, a través de la picadura de mosquitos, limitaba su campo de acción. Con motivo de accidentes de laboratorio, se constató mas tarde, que la enfermedad podía ser transmitida, además, por vía respiratoria, y llegar a ser severa en ocasiones. Luego, abrumadoramente desde 1960, ha comenzado a acumularse información sobre el agente causal. Se conoce su morfología, su modo de replicación en la célula huésped, se han estandarizado técnicas que permiten su diagnóstico temprano en el laboratorio, se siguen sus huellas en la naturaleza, y hasta se ensaya su control por una vacuna específica.

Sin embargo, si es verdad que mucho se ha avanzado, hay interrogantes que aún nos quedan por resolver. En nuestro país hemos venido observando las características de aparición de la enfermedad desde 1962. Nos llamó la atención que la mayoría de los brotes comenzaban en la península de la Guajira, al norte del Estado Zulia. Esta área semidesértica, no parecía propicia al desarrollo del vector ni al establecimiento de un foco enzoótico que determinara la aparición de las periódicas incursiones del agente, ya que otros investigadores, en diferentes regiones del mundo, lo hallaban asociado al tipo ecológico de bosque tropical húmedo.

Las páginas que siguen recogen nuestras experiencias en esta materia. Se ha hecho, previamente, una presentación formal del agente viral, de su biología y de la enfermedad que ocasiona, y nos hemos detenido a pormenorizar las investigaciones que realizamos desde 1962 en esta área del país. Aunque aún faltan muchas etapas por cumplir, hemos obtenido una mejor visión del problema y sabemos que andamos por buen camino.

Sirva la presente como un aporte a la solución de un grave problema de salud pública en nuestro país.

HISTORIA

En 1936, Kubes (71) describe un brote de "peste loca" ocurrido en Venezuela cerca de la frontera colombiana. Esta enfermedad parece haber aparecido en Colombia en 1935, en donde fue diagnosticada temporalmente como enfermedad de Borna (46). En 1938, una epizootia de grandes proporciones hizo su aparición en Venezuela y cruzó el país de oeste a este causando pérdidas inestimables de equinos (71). El virus aislado demostró ser inmunológicamente diferente a las cepas de las encefalitis equinas del este (EEE) y del Oeste (EEO) y a un virus de la Argentina. Sin embargo, en los estudios sobre protección cruzada se comprobó que los cobayos inmunes al virus de la EEE morían al serles inoculado el virus venezolano, aunque algunas veces ésto sucedía uno o dos días después que los controles no vacunados; todo lo cual hacía pensar en una remota relación inmunológica entre estos virus (71). Estos hallazgos fueron confirmados por Beck y Wyckoff (7), y el virus se conoce desde entonces como el virus de la encefalitis o encéfalomielitis equina venezolana (EEV).

Para aquella fecha, Higbie y Howitt habían demostrado que los virus de las encefalitis equinas pueden ser propagados en embrión de pollo, y desarrollado una vacuna en este sistema (46). Kubes y Ríos (71) estudiaron el comportamiento del virus venezolano en el embrión de 11-14 días, lo cual condujo a la producción de una vacuna similar a la de Higbie y Howitt. En 1939, el Centro de Investigaciones Veterinarias de Maracay, Venezuela, comenzó la producción de una vacuna en embrión de pollo para la prevención de la enfermedad en animales.

En Colombia, el virus fue aislado por Lleras y Figueroa en 1942, y ese mismo año Kubes estudia sus relaciones inmunológicas con el virus venezolano encontrándolos idénticos de manera general, aunque el virus venezolano poseía mayor poder antigénico (46). Sotomayor (118) afirma que, desde Colombia, la enfermedad se desplazó hacia el sur siguiendo la costa, apareciendo en algunas provincias del norte del Ecuador. Al virus aislado le fue asignada la misma identidad que el de Kubes y Ríos.

En 1943, otra extensa epizootia de EEV en equinos recorrió a Venezuela comenzando, como en 1938, por los estados occidentales y alcanzando el delta del río Orinoco y la costa este del país en el golfo de Paría (46). El total de casos reportados fue de 337 con una mortalidad del 83%. Este número parece haber sido en parte consecuencia de la activación de un virus de la vacuna usada durante la inmunización masiva (130). En la misma época aparecía un brote de encefalitis en la vecina isla de Trinidad (46, 72), incriminándose al *Aedes taeniorhynchus* como el vector de la enfermedad debido a su largo alcance de vuelo. Por experimentos de transmisión se demostró (47) que la enfermedad era mantenida entre los

equinos de Trinidad a través del *Mansonia titillans*, abundante en el área y bien conocido como equinofílico.

Aproximadamente 6 semanas antes del brote en equinos en Trinidad, un marino norteamericano murió con un cuadro encefalítico unas 20 millas al norte del foco animal (46, 98), y una niña de 8 años murió en coma (56). Las pruebas de laboratorio practicadas confirmaron el diagnóstico de EEV, siendo éstos los primeros casos humanos fatales reportados, hasta entonces, de infección natural. Sin embargo, en el estudio retrospectivo hecho por Tigert y Downs (130) en 1962, ponen en duda las muertes por EEV debido a que estas muestras fueron procesadas en un laboratorio que se encontraba trabajando activamente con el virus y posiblemente se trataba de una contaminación. A pesar de ello dejan constancia de que para aquella época se decía en Venezuela que la enfermedad había atacado a personas que trabajaban con los animales enfermos y que se caracterizaba por dolor de cabeza y fiebre alta sin síntomas de infección respiratoria alta ni cuadros neurológicos, y todos mejoraron. Citan los autores que en el Hospital de Niños de Caracas, los médicos afirmaron que la enfermedad era más frecuente en niños y era causa de parkinsonismo juvenil, hiperquinesia y problemas de conducta. Esos datos no fueron publicados.

Ese mismo año Casals y col. (19) y Lennette y Koprowski (75), reportan infecciones por EEV en personal de laboratorio. El virus fue aislado no sólo de la sangre, sino también de lavados de nasofaringe de los individuos enfermos. Contagio similar ocurrió en Trinidad durante el manejo de mosquitos infectados con el virus (130).

El primer reporte acerca de la infección natural por EEV fue hecho por Sanmartín y col. (106) quienes aislaron el virus de suero de humanos durante una epidemia de encefalitis en la región de El Espinal, Colombia, en 1952. Las características de la enfermedad fueron el comienzo brusco con malestar, escalofríos y fiebre; náusea y/o vómitos; dolor de cabeza, dolores musculares y óseos. La fiebre duraba de 24 a 96 horas y en la convalecencia se observaba una marcada astenia. En un niño de 8 años se observaron pérdida de la memoria y cambios de carácter. Aparentemente no hubo ningún caso fatal. El mosquito más frecuentemente hallado en la zona fue el *Aedes aegypti* y luego el *Culex fatigans*. Fue posible aislar el agente de ambas especies de mosquitos.

A partir de esa fecha el virus fue aislado de humanos en Brasil (23), Ecuador (4), y en 1955 y 1957 nuevamente en Colombia (51). En 1961 el virus se aisló en Panamá de un caso humano fatal (62), y luego en seis ocasiones de casos humanos febriles (42, 50).

Los primeros aislamientos en humanos, en Venezuela, ocurren en 1962, cuando, como en 1938 y 1943, hace su aparición un nuevo brote de EEV en la región de la Guajira, y de allí se extiende a lo largo de la costa norte de Venezuela (Figs 1 y 2). Los últimos casos son diagnosticados a fines de 1964 (2, 3, 113). En el estudio retrospectivo hecho por Avilán (2) se cita



Fig 1.— Epidemia de encefalitis equina venezolana. Consultantes de la Medicatura Rural de Sinamaica, Dtto. Páez, en noviembre de 1962. Obsérvese la gran afluencia de niños de la raza guajira que habitan esa zona.

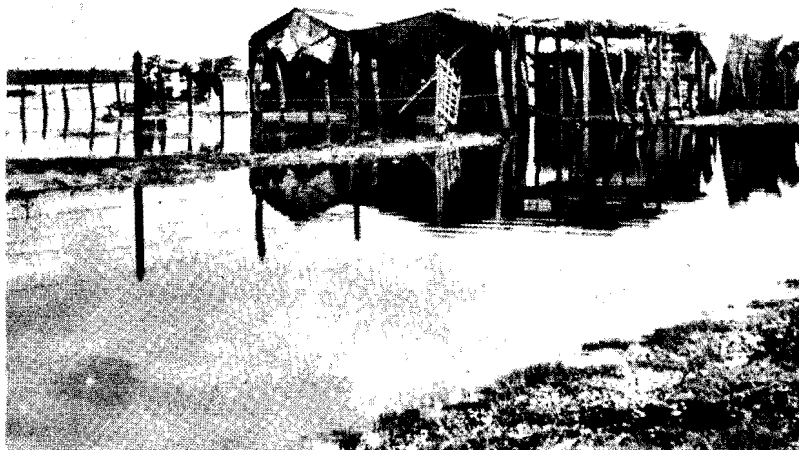


Fig 2.— Situación en que se encontraban los Dttos. Mara y Páez del Estado Zulia, debido al período prolongado de lluvias a fines de 1962.

que, mientras a fines de 1949 y principios de 1950 el médico veterinario de la zona reporta varios casos de encefalomiелitis en caballos y burros en localidades vecinas a Paraguaipoa, Dtto. Páez del Edo. Zulia, en los anuarios de epidemiología aparece un brote de "influenza" que comienza el 3.7.49 y finaliza el 11.3.50, con un total de 538 casos humanos. Así que el largo silencio ocurrido en Venezuela desde 1942 posiblemente fuera debido a confusión con otras enfermedades febriles. Asimismo, el brote de "encefalitis epidémica" en 1959 reportado por Negrette (90), sin duda fue debido a este agente viral. También en 1962, y simultáneamente al brote en Venezuela, la enfermedad fue diagnosticada en Colombia (108) durante una epidemioepizootia de idénticas características. En 1966 ocurre en Venezuela un brote de encefalitis en dos poblados del este del país (121).

El virus parecía extender su actividad hacia el norte únicamente hasta Panamá. En 1963 es aislado en Méjico de animales centinelas y de mosquitos del género *Culex* (110), y de la misma especie de mosquitos en el sur de la Florida (30). Una encuesta serológica practicada en 1965 en caballos sanos en Veracruz, Méjico (45), puso de manifiesto la presencia de anticuerpos neutralizantes contra EEV. Equinos expuestos como centinelas en la localidad, desarrollaron infección que se evidenció por la presencia de anticuerpos. En 1966 ocurre la primera epizootia de encefalitis en Méjico (86), y la primera también al norte de Panamá (34).

En 1968 el virus es aislado por primera vez en Norteamérica, de un caso humano febril en una localidad cercana a Miami, Florida (39). Para finales de ese año hace su aparición nuevamente en la región de la Guajira venezolana (117), y en 1969 llama la atención un brote más pequeño que afectó principalmente al Dtto. Mara del Edo. Zulia (104). Ese mismo año se reportan epizootias de la enfermedad en caballos y casos humanos en El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Méjico (60, 122). En 1970, ocurre un brote de encefalitis entre un grupo de soldados norteamericanos que se encontraba haciendo maniobras militares en la zona del canal de Panamá (41). A principios de agosto, se reportaron una epizootia en equinos y unos pocos casos en humanos, en Costa Rica, cerca de la frontera con Nicaragua (KM Johnson, comunicación personal). Finalmente, a fines de marzo y principios de abril de 1971, hace su aparición en forma epizoótica en el área de Tampico, Méjico, y a fines de junio es aislado en la misma región, de sangre de personas con síntomas de la enfermedad. La enfermedad se extendió hacia el norte, y el 1° de julio el virus es aislado de un caballo enfermo en Texas, Norteamérica. Hasta el 4 de septiembre se habían reportado 28 aislamientos de equinos y 84 de humanos (83).

Si bien las epidemias de EEV se han caracterizado por su escasa mortalidad, es importante destacar que la misma en equinos es sumamente

severa, lo cual viene a constituir un problema económico para aquellos países productores de equinos en escala comercial. Asimismo, el habitante de zonas rurales, que depende casi exclusivamente de ellos para su transporte y el de sus productos, es afectado seriamente por este tipo de enfermedad. Aún más, reportes preliminares permiten suponer que el virus es capaz de afectar gravemente a los niños, ocasionando en aquellos afectados en edad temprana de la vida, lesiones neurológicas que se traducen por retardo mental, cambios de carácter (10, 84, 106, 130), y en madres embarazadas puede conducir a abortos con necrosis cerebral del feto y anomalías congénitas (10, 137).

ETIOLOGIA

El virus de la EEV es un miembro del grupo A de los arbovirus (20). Todos los miembros de este grupo, que incluye a los virus de la encefalitis equina del este (EEE), encefalitis equina del oeste (EEO), Mucambo, Pixuna, Sindbis, Chikungunya, Semliki Forest, entre otros, son transmitidos por mosquitos (Tabla 1). La relación de grupo se basa en las reacciones cruzadas demostradas por las pruebas serológicas con antisueros hiperinmunes (21). A su vez, el virus de la EEV forma un "complejo" con los virus de Mucambo y Pixuna, debido a las similitudes antigénicas entre estos agentes (114, 142). A pesar de ello, los tres virus pueden ser diferenciados por las pruebas serológicas existentes. El que le sigue en afinidad es el virus de la EEE. Se ha demostrado (58), que animales inmunizados con el virus de la EEV aumentan su resistencia a la infección por el virus de la EEE, aunque lo contrario parece no ocurrir (17).

TABLA 1
ARBOVIRUS DEL GRUPO A QUE PRODUCEN ENFERMEDAD EN LOS HUMANOS

| VIRUS | VECTOR | DISTRIBUCION GEOGRAFICA | SINDROME PRODUCIDO |
|----------------|----------|--|-----------------------------|
| BEBARU | Mosquito | Malaya, Australia (?) | Fiebre, poliartritis |
| CHIKUNGUNYA | Mosquito | Africa, sudeste asiático, India, Filipinas | Fiebre, fiebre hemorrágica. |
| EEE | Mosquito | Américas, Filipinas (?) | Encefalitis |
| EEO | Mosquito | Américas | Encefalitis |
| EEV | Mosquito | Américas | Fiebre, encefalitis |
| MAYARO | Mosquito | Sur América | Fiebre |
| MUCAMBO | Mosquito | Sur América | Fiebre |
| O'NYONG NYONG | Mosquito | Africa | Fiebre |
| PIXUNA | Mosquito | Sur América | Fiebre |
| ROSS RIVER | Mosquito | Australia | Pcliartritis (?) |
| SEMLIKI FOREST | Mosquito | Africa | Fiebre |
| SINDBIS | Mosquito | Africa, India, sudeste asiático, Filipinas, Australia. | Fiebre |

Tabla 1. Arbovirus del grupo A que producen enfermedad en el humano. El grupo comprende, además, virus en los que no se ha demostrado, hasta ahora, su patogenicidad para el hombre.

Las diferentes cepas de EEV aisladas en las Américas fueron estudiadas mediante la prueba cinética de inhibición de la hemaglutinación, lo cual permitió a Young y Johnson (141) demostrar, que las cepas de una misma localidad eran antigénicamente similares cualquiera fuera su fuente de origen o número de pasaje, y que era posible diferenciar los aislamientos provenientes de los distintos países en donde el virus ha estado activo. Así, la cepa de Florida es antigénicamente diferente al resto de las cepas estudiadas, lo cual es de importancia epidemiológica, ya que sugiere que el virus no fue introducido en Norteamérica desde América Latina sino que ha sido endémico en la Florida por muchos años.

El virus se multiplica en una gran variedad de cultivos celulares produciendo destrucción de la monocapa o placas pequeñas, redondeadas, bajo agar (Fig 3). Los cultivos más utilizados han sido los fibroblastos de embrión de pollo, las células de riñón de hamster recién nacido, y últimamente se usan con mucho éxito las VERO (derivadas de riñón de mono verde africano). Se ha observado atenuación de la virulencia por pasajes seriados del virus en cultivos celulares (9, 70).

El agente es patógeno para muchos animales de experimentación a los cuales causa una lesión fatal. Estos incluyen al ratón, cobayo, hamster,

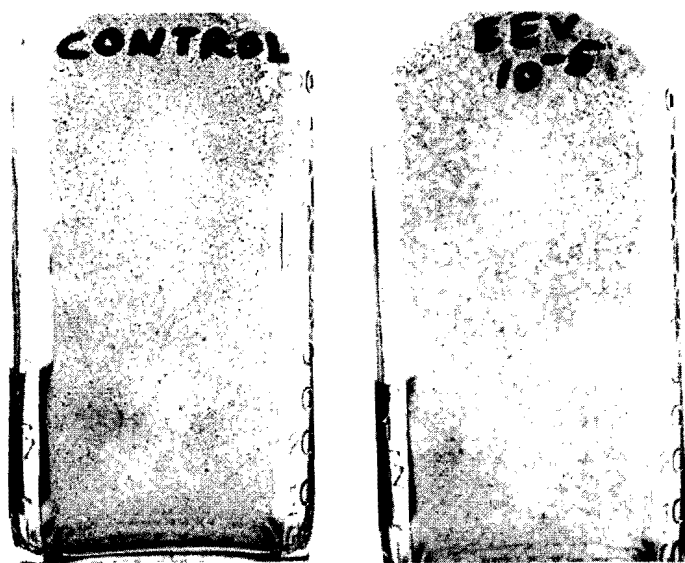


Fig 3.— Encefalitis equina venezolana. Producción de placas pequeñas, redondeadas, en cultivos de células de fibroblastos de embrión de pollo, cubiertas con capa de agar.

conejo, embrión de pollo, entre otros. Sin embargo, un estudio comparativo de los efectos patológicos del virus demostró (134), que en el cobayo y en el conejo las lesiones predominantes eran en el sistema linfopoyético, mientras que en el ratón y en el mono, era el tejido nervioso el más afectado, independientemente de la vía de inoculación.

Visto al microscopio electrónico (Fig 4), el virus de la EEV es una partícula redondeada que mide de 65 a 75 nm con un centro denso de 30-40 nm de diámetro (61, 68, 89). Es uno de los virus que contienen ácido ribonucleico que parece estar enrollado en espiral constituyendo el nucleoide. La envoltura exterior, menos densa en el microscopio electrónico, parece estar constituída por lipoproteínas.

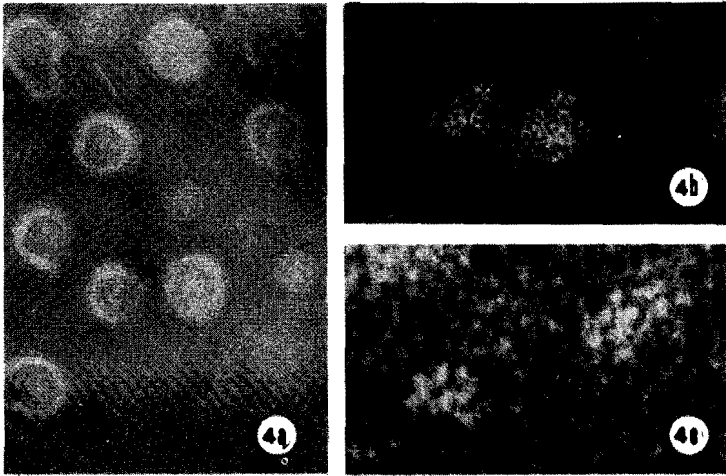


Fig 4.— Micrografías electrónicas del virus de la EEV purificado en gradiente de sacarosa. a) Partículas completas de 55-60 nm de diámetro. 162.500 X. b) Nucleocápsidos de 30-40 nm, compuestos de subunidades redondeadas y huecas de 10-12 nm de diámetro. 450.000 X. c) Partículas de 12-18 nm encontradas en la fracción hemaglutinante del gradiente. 845.000 X.

En nuestro laboratorio hemos tratado al virión maduro con desoxicolato de sodio (DOC) y logrado separar el nucleocápsido de la envoltura (resultados aún no publicados). Al microscopio electrónico (Fig 4) el nucleocápsido parece estar compuesto por subunidades en forma de anillos de 10 a 12 nm, que representan a los capsómeros, y que parecen estar organizados en simetría icosaédrica. En la fracción de la envoltura observamos unas estructuras de 12 a 18 nm, rodeadas de pequeñas proyecciones. En esta fracción se halló la actividad aglutinante, por lo que inferimos que las partículas observadas corresponden a las hemaglutininas del virus.

El análisis de preparaciones virales, purificadas en un gradiente de sacarosa, mostró que el virus contenía 24,3% de lípidos y 6,2% de ácido ribonucleico (135). La remoción de los lípidos de la envoltura se traduce en degradación de la partícula, acompañada por pérdida de la infectividad (128). La inactivación es debida a la pérdida del poder de adherencia del virus a la célula susceptible, y no a la ruptura del cápsido y liberación del ARN-infeccioso ni a la destrucción de éste dentro del virus (138). La formalina no inactiva completamente al virus (125). El tratamiento con betapropiolactona (57) y la irradiación con rayos gamma (53, 100), hacen que pierda su infectividad, conservando, sin embargo, sus propiedades inmunogénicas.

REPLICACION DEL VIRUS

En estudios *in vitro* con inmunofluorescencia se observó que el virus se adhiere a la membrana de la célula por algunos minutos (54). Este fenómeno es independiente de la temperatura, al contrario de la penetración que se hace más rápida a 35°C, lo que sugiere al autor que en el proceso participan enzimas celulares. La penetración, a esta temperatura, se cumple en 30 minutos. Sin embargo, temperaturas de 44°C inhiben la replicación del virus (145). La inhibición parece cumplirse en dos momentos del ciclo: el primero, reversible, en algún punto entre la entrada del virus a la célula y su desnudamiento, y el comienzo de la síntesis de ARN viral; el segundo, irreversible, ocurre en un punto después de la síntesis de ARN viral y antes de la formación de proteínas virales.

El virus parece penetrar a las células por viropexis (16); la ribonucleoproteína es liberada e induce la síntesis del material viral. La síntesis del ARN infeccioso (147) se pone de manifiesto a las dos horas después de la infección y aumenta progresivamente, alcanzando un máximo entre 3,5 a 5 horas. La adición de actinomicina D no afecta la producción del ARN viral. En cambio, la puromicina, añadida inmediatamente después de la inoculación con EEV, inhibía completamente la reproducción del virus (146).

Cuatro horas después de la infección con el virus de la EEV, se pone de manifiesto, mediante la inmunofluorescencia, la presencia del antígeno celular de superficie (55). Este resultado depende de la presencia de partículas virales infecciosas, ya que si se inactiva previamente el virus con luz ultravioleta o calor, no se produce. La aparición del antígeno de superficie precede a la aparición del antígeno citoplasmático y no es afectado por la adición de interferon (inhibidor de la síntesis de ARN viral), lo que no ocurre con la formación del antígeno citoplasmático que sí se reduce hasta en un 93%. Sin embargo, si se añadía inhibidores de la síntesis de proteínas como puromicina o ciclohexamida, inmediatamente

después de la adsorción, no pudo ponerse de manifiesto ninguno de los dos antígenos. Todo lo cual significa que el antígeno de superficie o es una proteína nueva sintetizada como una función temprana de la replicación del genoma viral, o es un componente de la membrana celular modificado por la infección viral.

En experiencias con células cultivadas KB (88), las primeras alteraciones que se suceden en estas células y que aparecen una hora después de la infección con el virus, son el aumento en el citoplasma del número de cuerpos densos rodeados de gránulos. Cuatro horas después se observan vacuolas rodeadas de partículas esféricas de 40-45 nm de diámetro y unas más pequeñas, de 25-45 nm, que parecen representar precursores virales. Se observan estructuras fibrilares en el citoplasma, y probablemente en el núcleo, de fibroblastos de embrión de pollo 4-6 horas después de la infección (16). De estas estructuras emergen nucleoides del virus de 30-40 nm, por lo que fueron denominadas "factorías" o "viroplastos". En células nerviosas de ratones inoculados con el virus de la EEV (44), los resultados sugieren que en el citoplasma comienzan a aparecer masas de material reticulogranular, generalmente en la vecindad del complejo de Golgi, y alrededor de ellas se van a formar las partículas precursoras.

Los autores coinciden en afirmar (16, 44, 88), que las partículas precursoras maduran en las membranas intracitoplasmáticas y el virión se forma al adquirir el nucleoide la cubierta que le facilitan las membranas del retículo endoplasmático, del aparato de Golgi, de vacuolas intracitoplasmáticas o de la membrana de la célula. Finalmente, el virus completo o virión sale de la célula por gemación.

PATOGENIA

La patogenia de la infección por el virus de la EEV ha sido estudiada por Berge (8), quien encuentra que infectando ratones por vía peritoneal se obtienen títulos máximos de viremia a las 24 horas y se mantiene alta por tres días, para luego caer abruptamente. Sin embargo, en el cerebro, a pesar de que fue posible detectar el virus a las 24 horas, no fue sino después de 48 horas cuando se obtuvieron los títulos más altos. No hubo evidencia histológica de encefalitis en las secciones de cerebro de ratones adultos sacrificados antes del 4° día después de la infección i.p. con el virus. Parecería que el sitio primario de multiplicación son los tejidos y no el sistema nervioso. Tasker (127) demuestra, que el virus alcanza un título significativo en el cerebro más lentamente que en el resto de los tejidos estudiados (sangre, médula ósea). Kundin (73, 74) por el contrario, encuentra mediante la inmunofluorescencia, que el virus aparece con más frecuencia en el cerebro y las glándulas salivales. Recientemente García

Tamayo (comunicación personal) observó al microscopio electrónico las partículas precursoras y maduras del virus, en el tejido cardíaco de ratones infectados con EEV; sin embargo, no sabemos si esta localización es primaria a la multiplicación en el sistema nervioso ya que el estudio no fue hecho de manera seriada. Es evidente, sin embargo, que el virus afecta el tejido cardíaco, según se desprende de las anomalías observadas en el electrocardiograma practicado a pacientes con la enfermedad (1, 39). Estos cambios transitorios consistieron en una disminución o inversión de la onda T, en un 48% de los enfermos. Asimismo, García Tamayo (comunicación personal) demuestra la replicación del virus en las células intersticiales del alvéolo pulmonar en ratones infectados experimentalmente.

Otro dato importante que se desprende de los trabajos de Berge y col. (8) y de los de Gleiser y col. (48), es que la reacción inflamatoria observada en el cerebro de animales infectados con EEV parece corresponder mas bien a la combinación *in vivo* de antígeno viral con su anticuerpo, que a la injuria celular producida por el virus solo. Apoya esta hipótesis el hecho de que la inyección de suero inmune anti EEV, a animales previamente infectados con el virus, aceleró la aparición de lesiones en el sistema nervioso (8) y por el contrario, la administración de cortisona suprimió la respuesta inflamatoria (48).

Las lesiones histopatológicas halladas en humanos (136) han sido desde el punto de vista general, una fuerte hiperemia en las vísceras, particularmente de la mucosa faríngea, bronquios, pulmones, ganglios linfáticos, bazo y mucosa intestinal. La hiperemia no se acompañaba de manifestaciones inflamatorias con excepción de los pulmones, donde había microscópicamente una fuerte infiltración peribronquial e intersticial, predominantemente linfocitaria, con sólo raras veces la presencia de polinucleares en los alvéolos pulmonares. Johnson y col. (62) encuentran miocarditis de predominio intersticial, congestión pulmonar, daño tubular renal y necrosis focal de las células hepáticas con prominencia de las células de Kupfer, y depleción del sistema linfopoyético (nódulos linfáticos, bazo). En el sistema nervioso (35), las lesiones que caracterizan al proceso están localizadas preferentemente a nivel del tallo encefálico, y en especial a la altura de la sustancia negra. A este nivel se observan densos infiltrados perivasculares en forma de manguitos. En las células ganglionares de la sustancia negra se ve marcada disminución de la pigmentación, fenómenos de cromolisis y picnosis nuclear. No se observan imágenes de neuronofagia.

La enfermedad que se produce en el caballo no es siempre una encefalitis; al contrario de EEE y EEO en las cuales la forma encefálica es la única manifestación de infección (66). Los cambios patológicos observados en animales infectados experimentalmente, incluyen lesiones

pancreáticas y comprometimiento del tejido hematopoyético. En la corteza cerebral de animales naturalmente afectados se observa (101) una reacción inflamatoria perivascular, que varía desde linfocítica exclusiva hasta una mezcla linfocítica-neutrofílica. Se halló necrosis vascular en todo el cerebro. Las zonas del núcleo caudado-tálamo tuvieron una reacción perivascular menos intensa. En el cerebro aparecieron nódulos gliales en las capas molecular y granulosa, y necrosis de las células de Purkinje; y en la médula espinal sólo se observaron nódulos gliales. Los autores suponen que estos severos cambios, al contrario de los observados en los caballos infectados experimentalmente (66), se debe quizás a que estos animales murieron después de un largo período de enfermedad con sintomatología neurológica.

CUADRO CLÍNICO

El virus de la encefalitis equina venezolana es virulento y altamente neurotrópico. Ataca principalmente a los equinos (burros y caballos) y al humano, generalmente en forma epidémica.

La enfermedad en los caballos puede manifestarse predominantemente con síntomas de comprometimiento del sistema nervioso central o como enfermedad generalizada febril y aguda (46, 66, 67, 77). Los que desarrollan esta última forma de la enfermedad tienen un período de incubación de 24 a 78 horas seguido de alza de temperatura. El animal se mantiene en una actitud de depresión con poco interés en lo que lo rodea. La diarrea es un signo frecuente. El pulso es fuerte y rápido. Hay inapetencia y pérdida de peso. Si el caso evoluciona favorablemente, la temperatura regresa a lo normal y la convalecencia es bastante larga. La fiebre persiste en los casos fatales. El animal se torna más débil y cae repetidas veces; luego es incapaz de levantarse y muere. El curso total de la enfermedad es de 2-4 días.

El síndrome encefalítico se traduce por fiebre, somnolencia, anorexia y diarrea. El animal se hace irritable e intenta morder o cocear a su amo. Los síntomas se tornan progresivamente más severos. La cabeza se apoya contra objetos firmes y el animal hace movimientos como de masticación; sin embargo, no puede masticar ni tragar y la saliva cuelga de la boca. Los movimientos respiratorios disminuyen; se observan espasmos musculares aislados en las ancas y espalda. Las patas se separan como si el animal tratara de conservar el balance o camina en círculos con paso inseguro y cruzando las patas (Fig 5). Las convulsiones se hacen cada vez más frecuentes y el animal, imposibilitado de levantarse, yace sobre un costado moviendo continuamente sus extremidades, hasta la postración y muerte. El curso de la enfermedad, al igual que la anterior, es de 2-4 días. La mortalidad en caballos que desarrollan síndrome encefalítico, es de 90%.

La enfermedad es similar en los burros, pero la mortalidad parece ser algo menor (80%). Se ha observado estomatitis ulcerosa en mulas y burros, y abortos en yeguas (46).

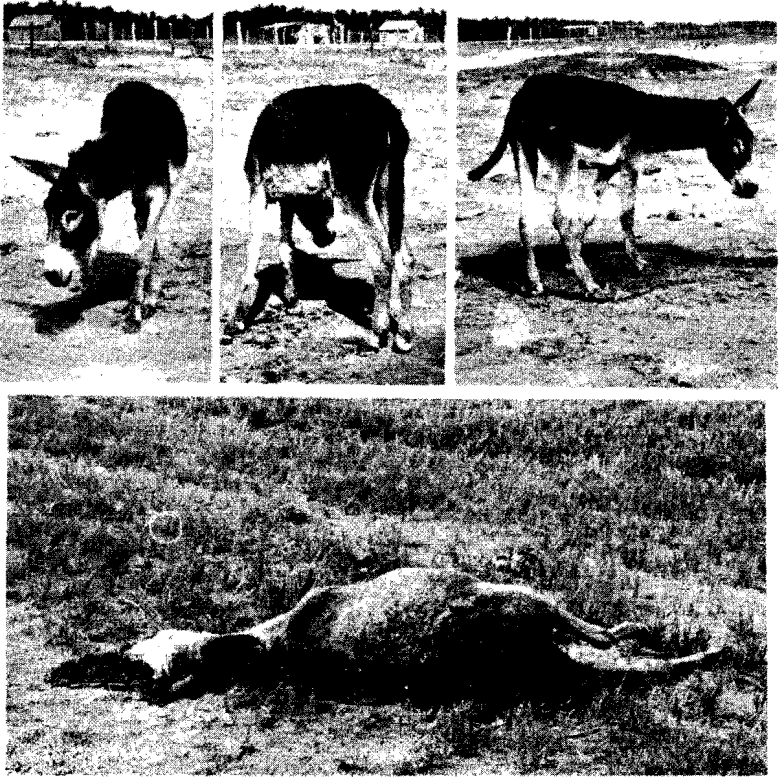


Fig 5.— Composición fotográfica en la que se observa la característica actitud del equino de caminar en círculos, cuando es afectado por el virus de la encefalitis equina venezolana. Finalmente cae sobre un costado y muere.

Los primeros reportes sobre la enfermedad en humanos (19, 106, 130) la señalaban como de carácter leve. Sin embargo, la información obtenida después de epidemias o infecciones accidentales en el laboratorio la hacen ver como más severa.

Las descripciones de infecciones naturales (22, 39, 41, 60, 77, 91, 106) y de laboratorio (6, 19, 43, 75), o sobre la aparición de enfermedad después de la vacunación (125), coinciden en afirmar que es de aparición brusca y se caracteriza por fiebre alta, dolor de cabeza intenso, vómitos y

fuertes dolores de huesos, músculos y articulaciones. El individuo se siente mareado, somnoliento, pero el dolor de cabeza intenso le impide en ocasiones conciliar el sueño. Hay además fotofobia, anorexia, debilidad general, diarrea en algunas ocasiones. La conjuntivitis y la faringitis son síntomas frecuentes. Sin embargo, no hay otros síntomas que lo hagan confundir con alguna enfermedad respiratoria. La enfermedad natural es más frecuente en menores de 15 años, llegando a representar entre el 42 y el 75% de los individuos afectados (2, 91). En niños pequeños son frecuentes las convulsiones, reacciones meníngeas y aún el coma. El cuadro sintomático dura entre 2-5 días, prolongándose en los casos más severos (Figs 6 y 7). La convalecencia es larga y es notable la astenia que la caracteriza. La mortalidad reportada en las epidemias ocurridas en Venezuela (2, 104, 117), no pasa del 0,6%, y las muertes ocurrieron con mas frecuencia en menores de 15 años.



Fig 6.— Joven de 16 años que ingresó con un cuadro clínico severo a la Medicatura Rural de San Rafael, Dtto. Mara, durante la epidemia de encefalitis equina venezolana que azotó a esa región a fines de 1969. La paciente murió cinco días después de la aparición de los síntomas.

La triada fiebre, cefalea, vómitos, está presente en un 50% de los casos aproximadamente (22). Faringitis en un 87%, conjuntivitis en un 34%. En niños pequeños, la depresión sensorial y las convulsiones alcanzan un 80%. Sin embargo, a pesar de que en la epidemia de 1969 en Centroamérica (60), la fiebre fue el síntoma mas frecuente (62%), en sólo el 34% de ellos fue posible demostrar la presencia de anticuerpos. Por el contrario, aquellos individuos que presentaron vómitos y que sólo constituían el 33% de los casos, tuvieron una tasa de positividad del 44%. Todo ésto parece demostrar que, en materia clínica, no hay síntoma o síntomas que sirvan



Fig 7.— Epidemia de encefalitis equina venezolana en el Dtto. Mara, en 1969. Dispensario en Los Mayales, caserío en donde murió un niño con cuadro clínico severo. Madre e hijo consultaban al mismo tiempo, con idénticos síntomas.

como indicadores de infección por EEV. Resultados semejantes obtuvimos en la epidemia de EEV de 1969 en el Estado Zulia (104). En aquellos individuos que presentaron la triada sintomática, y que representaban el 66% de la muestra estudiada, apenas el 37% reveló aumento de la tasa de anticuerpos IH en pares de sueros. En 9 pacientes en los que, además de la triada presentaban síntomas neurológicos, se logró el diagnóstico serológico en 5 de ellos (56%).

Probablemente, el cuadro clínico descrito, es sugestivo sólo cuando se observa un número exagerado de casos en zonas de comprobada actividad viral.

Debe añadirse, que durante la epidemia de 1962 en Venezuela se reportaron lesiones en embriones de madres que sufrieron la enfermedad; mucho mas severas mientras mas temprana era la gestación (137). Esto sugiere la transmisión transplacentaria del virus. Otro hallazgo importante reportado por Sanmartín y Osorno en Colombia (106), por Bermúdez en Venezuela (10) y Mucha-Macías en México (84), es la aparición de secuelas, especialmente en niños: pérdida de la memoria, cambios de carácter, retraso mental, entre otros.

En los exámenes de laboratorio practicados a personas que han sufrido la enfermedad se ha encontrado en el líquido cefalorraquídeo (22), hiperglucorraquia en un 72% de los casos; citología normal o discretamente elevada en un 75%, con predominio franco de linfocitos en la

fórmula; cifras bajas de cloruros en un 50% de los casos; transaminasa oxalacética y deshidrogenasa láctica normales (39) o aumentadas (124); e inversión del índice albúmino-globulínico con marcado descenso en las albúminas y aumento en la fracción beta (124).

El estudio hematológico revela leucopenia en la gran mayoría de los casos humanos (1, 6, 18, 22, 94, 125) y animales (49, 66). Sin embargo, otros autores (39, 62, 77) obtienen cifras hasta de 25.000 por ml en humanos. En cuanto a la fórmula, las discrepancias son aún más manifiestas y éstas pueden ser debidas a la fecha de la toma de la muestra. En estudios seriados (1, 18) se observa, que después de una neutropenia en los primeros días, las cifras se elevaron hasta límites normales y persistieron así hasta quince días. Mientras unos autores hablan de neutrofilia (22, 39, 62, 77), otros encuentran tendencia a la linfocitosis (125). En un estudio de 50 pacientes con EEV, Negrette (92) encuentra que los casos se repartieron casi por igual entre neutropenia y neutrofilia (42% y 44%), observando linfocitopenia en un 48% de ellos. En equinos se suceden las mismas diferencias. Gochenour y col. (49) determinan que la leucopenia en burros a los cuales se les administró vacuna EEV viva, era a expensas de una caída en los linfocitos. Por el contrario, Kissling y col. (66) infectando caballos experimentalmente, observaron que la reducción en el número de células afectaba principalmente a los neutrófilos, aunque se vio igualmente ligero descenso en los linfocitos. En ambos, la leucopenia se mantuvo mientras duró la viremia y retornó a lo normal al desaparecer ésta.

Otros hallazgos en sangre han sido (39, 124): valores bajos en calcio; normales o ligeramente altos para deshidrogenasa láctica y transaminasa oxalacética, e hipoproteinemia.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico definitivo sólo puede hacerse por el aislamiento e identificación del agente. Sin embargo, es bueno recordar que las características epidemiológicas de la enfermedad en algunas regiones como en Venezuela, nos permiten sospechar la presencia del virus en ocasión de una epidemioepizootia en las zonas del país periódicamente afectadas.

El virus puede ser aislado del suero sanguíneo humano hasta el tercer día después de la iniciación de los síntomas, en un 42% de los casos (12). Esta frecuencia se hace mayor si tomamos la muestra en período más temprano. En 79 casos de encefalitis en los cuales se aisló el virus de la sangre, Briceño (13) encuentra que en 9 de ellos (11%) el virus pudo ser aislado también del exudado faringeo. Este hallazgo, y los ya reportados

anteriormente (6, 19, 75, 116, 125), permiten suponer que la infección puede ser transmitida de persona a persona por vía respiratoria, lo que aumenta considerablemente el contagio. Kissling y col. (66, 67) demostraron la transmisión aérea del virus entre caballos. Hay que hacer hincapié en la dificultad de aislar el virus en equinos, cuando ya éstos presentan signos de la enfermedad. Los que se han logrado, han sido siempre en animales asintomáticos, cuya única manifestación es un alza, a veces insignificante, de la temperatura.

Negrette (90, 93) afirma, que en una situación epidémica es posible el diagnóstico de la enfermedad, mediante el estudio de los leucocitos de sangre periférica de estos pacientes. Postula el autor que las vacuolas observadas en las células blancas son el efecto directo de la acción del virus. Esta acción destructiva se manifiesta igualmente por el aumento del número de restos leucocitarios observados en sangre periférica de pacientes con encefalitis venezolana (96). Utilizando los leucocitos obtenidos en un "buffy-coat" de sujetos que habían sido inmunizados con la vacuna viva contra EEV, Feigin y col. (40) practicaron la técnica de la inmunofluorescencia y observaron partículas fluorescentes en un 85% de los casos; siendo más frecuentes en los polimorfonucleares, pero observándose también, aunque en menor grado, en los linfocitos.

En el laboratorio, el virus se reconoce por su efecto sobre los animales de experimentación, ratones y hamsters recién nacidos, a los cuales mata entre 24 y 48 horas. Los embriones de pollo, inoculados por cualquier vía, mueren en 15-48 horas, siendo el embrión la estructura que contiene la más alta concentración de virus (7, 69, 71).

Los fibroblastos de embrión de pollo (87), las células BHK21 (112), y las VERO, son los cultivos más sensibles. La prueba más utilizada actualmente para el diagnóstico de EEV es la reducción de placas en células VERO (38). Usando la técnica de la inmunofluorescencia, el virus pudo ser detectado en cultivo de células de corazón de cobayo, 10 horas después de la infección experimental (80).

Se usan tres pruebas serológicas rutinariamente en el diagnóstico de la EEV, y son por orden de especificidad: a) la de neutralización, b) la de fijación del complemento, y c) la de inhibición de la hemaglutinación. Los procedimientos generales son bien explicados por Hammon y Sather (76).

Los anticuerpos neutralizantes aparecen generalmente pocas horas después de la infección, y pueden persistir durante toda la vida del animal en títulos significativos. Es la prueba más vieja, más usada, más confiable, fácil de interpretar y más específica. Está basada en el principio de que, cuando se añade un suero inmune específico a su virus correspondiente,

éste pierde su infectividad, o sea que es "neutralizado". Para poner de manifiesto este efecto, es necesario el uso de tejidos vivos como animales de laboratorio o cultivos celulares. Uno de los problemas que se ha encontrado en el uso de esta prueba es la pérdida, debido al almacenamiento de las muestras, de un factor accesorio lábil presente en el suero. Esto puede ser subsanado agregando suero humano normal fresco, sin anticuerpos contra el virus que se está estudiando. Como no todos los sueros humanos contienen este factor, es necesario probarlos previamente (32).

Los anticuerpos fijadores del complemento aparecen tardíamente en el curso de una infección, alcanzan títulos altos, pero persisten por corto tiempo, lo cual es índice de lo reciente de una infección. La prueba se basa en la propiedad que poseen los complejos antígeno-anticuerpo de combinarse con el complemento presente en el suero de algunos animales como el cobayo.

La base de la prueba de inhibición de la hemaglutinación radica en el hecho de que algunos virus poseen la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de ciertas especies de animales y del hombre, y que el anticuerpo específico previene o inhibe esta aglutinación. Cuando se usa esta prueba se obtienen reacciones cruzadas con otros virus del mismo grupo, en un alto porcentaje de casos. Sin embargo, Sanmartín y Dueñas aseguran (107), que aquellos títulos de 1:80 o más, son sin lugar a dudas debidos a infecciones por EEV, corroboradas por la prueba de neutralización. Los anticuerpos IH aparecen algo más tarde que los neutralizantes, pero preceden a la aparición de los fijadores de complemento. Las encuestas serológicas practicadas permiten suponer, que estos anticuerpos son de larga duración, con muy pequeñas caídas del título y que se pueden detectar durante toda la vida del huésped vertebrado.

EPIDEMIOLOGIA

Vectores.

Ya desde los primeros brotes en Venezuela se sospechó que los mosquitos transmitían el virus de la EEV, debido a su similitud con los agentes de las otras encefalitis. La primera evidencia de que los mosquitos eran capaces de transmitir el virus en condiciones de laboratorio, fue obtenida por Roubaud y col. (67) con varias especies de *Aedes*. Gilyard en 1944 (47) recogió *Mansonia titillans* de un burro enfermo en Trinidad, los incubó por 6 días y demostró que podían transmitir la infección al picar un burro sano. Este hallazgo concuerda con la definición de vector biológico que propone la OMS (97) para diferenciarlo de la simple transmisión mecánica (pág 24).

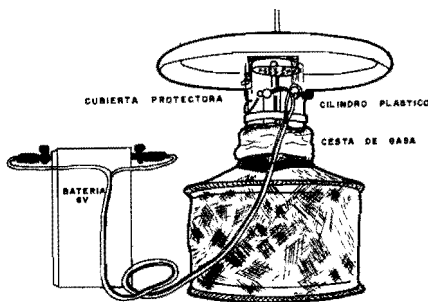
Otras especies de mosquitos en los cuales se ha demostrado la transmisión han sido *Aedes taeniorynchus* y *Culex quinquefasciatus* (77), *Mansonia perturbans* y *Psorophora ferox* (28), *Aedes triseriatus* (66), *Aedes scapularis* (120) y *Aedes aegypti* (121). En la EEV no se conoce nada de la relación virus-vector. Trabajos con dos virus del mismo grupo (EEE y Semliki Forest) han dado resultados contradictorios. Por un lado Mims y col. (82) encontraron que mosquitos *A. aegypti* infectados con Semliki Forest eran incapaces de alimentarse al cabo de 21 días y se observaron lesiones histológicas en sus glándulas salivales. Por el contrario, Whitfield y col. (138) observaron una extraordinaria adaptación entre EEE y *A. triseriatus*, con grandes cantidades de virus en las glándulas salivales del mosquito, y ausencia de citopatogenicidad. Discuten los autores la posibilidad de que el mejor vector es aquel que mejor se adapta al agente viral.

La concentración de virus que se requiere para infectar un mosquito fue determinada por Corrigan (67) y fue del orden de $10^{3,1}$ dosis letales 50 (ratón adulto i.p.). Se sabe que esta concentración llega a desarrollarse en la sangre de varias especies de roedores y caballos (66), murciélagos (27), y aún en el hombre (12), lo que sugiere que durante una epidemia existen muchas fuentes de infección para el mosquito. Los pájaros, en contraste, desarrollan títulos bajos de viremias y no constituyen buenas fuentes de infección (29). Se considera por tanto, que si bien los pájaros podrían ocasionalmente llevar el virus de un área a otra, los huéspedes primarios son probablemente los mamíferos.

Los trabajos de Downs y col. (36), en Trinidad, revelaron que el virus de la EEV está asociado a un ciclo enzoótico en la naturaleza, que envuelve a pequeños roedores salvajes y mosquitos del género *Culex* (*melanoconion*) en ausencia de enfermedad. Este patrón fue confirmado subsecuentemente en Panamá (50), Méjico (110) y sur de la Florida (30). Sin embargo, los hábitos restringidos del *Culex* (*melanoconion*) hacen pensar que éste no es el responsable de la amplia diseminación de la enfermedad en humanos, y que sean otras especies susceptibles como el *Aedes taeniorynchus* o *Psorophora confinnis*, las que llenen este papel (67).

Kissling y Chamberlain afirman (67), que el ciclo endémico del virus depende de una especie susceptible de mosquitos con hábitos restringidos y en cercana asociación con un huésped vertebrado que se renueva rápidamente. Esto es importante para mantener un suministro de animales no inmunes. Por el contrario, el ciclo epidémico requiere una o más especies de mosquitos de amplia distribución, agresivos, y con variados hábitos alimenticios. Los huéspedes, por supuesto, deben ser susceptibles y poseer suficiente cantidad de virus en su sangre para infectar más mosquitos y mantener la epidemia.

Se ha demostrado (30, 31, 36, 50, 65, 110, 142), que roedores salvajes y mosquitos del género *Culex* (melanoconion) llenan los requerimientos del ciclo endémico, mientras que los equinos (66) y el hombre (12), y varias especies de *Aedes* y *Psorophora* (31, 121) pueden diseminar la enfermedad durante una epidemia. Sin embargo, la sola combinación de mosquito, virus y huésped no asegura una epidemia. Es necesario la unión de varios eventos favorables: pico de viremia durante la época en que la población de roedores esté en su tope, coincidente con una alta población de los vectores epidémicos en áreas cercanas, más una población humana y equina susceptible (Fig 8).



TRAMPA CDC PARA CAPTURA DE MOSQUITOS

Fig 8.— Trampa para la captura de insectos voladores. La batería de 6 voltios enciende un pequeño bombillo y pone a funcionar un ventilador, que se encuentra en el cilindro plástico. Los insectos son atraídos por la luz y caen en la cesta de gasa, al ser succionados por el vacío que produce el ventilador en movimiento. La cubierta sirve para proteger las capturas de la lluvia.

El virus ha sido aislado además, de *A. serratus* y *An. aquasalis* (113), *P. confinnis* (31, 113), *A. atlanticus* y *An. crucians* (31). Recientemente se ha determinado la presencia del agente en mosquitos de las cangrejas (Género *Deinocerites*), por los investigadores del CDC en las zonas de Costa Rica afectadas por la epidemioepizootia de 1970.

Animales Salvajes.

En la naturaleza el virus ha podido ser aislado de monos centinelas y de una especie de *Proechimys* (25); de ratones blancos suizos centinelas, de las ratas *Oryzomys laticeps* (65) y *Sigmodon hispidus* (50), de los ratones *Zygodontomys brevicauda* y *Heteromys anomalus*, y de una *Marmosa mitis* (65). Además de que se ha demostrado la presencia de anticuerpos en estas especies (25, 31, 50, 65), se encontraron también en el ratón *Peromyscus gossypinus* (31) y *maniculatus* (129), en *Didelphis marsupialis* (50, 113), en conejos del género *Sylvilagus* (124), la rata común o *Rattus rattus* (50, 65), la rata *Hoplomys gymnurus* y dos especies de ardillas, *Sciurus granatensis* y *S. variegatoides* (50).

Las experiencias de Young y col. (143) con las ratas *Sigmodon hispidus* y *Proechimys semispinosus* (que han sido señaladas como huéspedes del virus de la EEV en Panamá), han determinado que existe en ellas una viremia que dura 4-5 días, alcanzando los más elevados títulos en el 2° día después de la inoculación experimental. Los valores en *Sigmodon* fueron más altos, y el virus pudo ser aislado de la garganta del animal hasta el 7° día. Zárate y Scherer (144) infectan igualmente a *S. hispidus* con el virus y observan viruria que dura de 2-8 días. Si la orina se instila por vía intranasal a nuevas ratas se logra la transmisión de la infección, demostrable por la presencia de anticuerpos. Lo mismo ocurre cuando colocan en una misma jaula animales sanos e infectados; con lo cual concluyen que la infección puede ser transmitida en la naturaleza por contacto directo a través de orina, heces, naso y orofaringe, como vías adicionales a la transmisión por el mosquito.

Otro reservorio potencial para EEV lo constituyen los murciélagos. En 1956 Corrigan y col. (27) reportaron la infección experimental y desarrollo de altas viremias en dos especies de murciélagos. Recientemente Wong-Chia y Scherer (139) aislaron el virus de vísceras de un murciélago frugívoro en Méjico. Este hallazgo, y su frecuente proximidad a los mosquitos, hombres y equinos, indican que los murciélagos pueden muy probablemente, servir como fuente de virus para los mosquitos vectores durante los períodos de viremia.

Los hamsters han resultado ser de muchísima utilidad para detectar la actividad endémica del virus de la EEV (110, 119), y así Sanmartín y col.

(109), utilizando hamsters centinelas, aislaron por primera vez el virus en la costa del Pacífico en Colombia, cerca de la frontera con Ecuador, de cuya presencia se tenían sólo datos de serología (Fig 9).

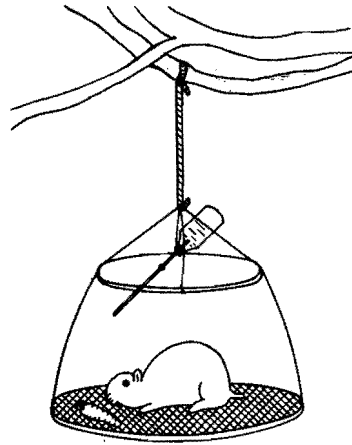


Fig 9.— El hamster (*Mesocricetus* sp.), pequeño mamífero roedor muy susceptible al virus de la encefalitis equina venezolana, es colocado en el área de estudio, expuesto a la picadura de los mosquitos, por una a dos semanas. Si la zona es asiento de un foco enzoótico, el animal sucumbirá por efecto de la picadura del mosquito infectado.

Animales Domésticos.

Sellers y col. (113) demostraron la presencia de anticuerpos en el suero de cabras, ovejas, perros, gatos, cochinos y ganado vacuno, después de la epidemia de 1962 en Venezuela. Estudios con perros infectados experimentalmente demostraron que éste presentaba fiebre, leucopenia, y una viremia muy baja de corta duración (126). Sin embargo, en un estudio posterior (33), se logró transmitir la enfermedad por contacto directo a los perros controles, y por picadura de *A. triseriatus* (y no *A. aegypti*) a cobayos. En Panamá se han demostrado anticuerpos en perros (50).

Con relación a vacunos, se han determinado anticuerpos, aunque en proporción pequeña, en Utah, Norteamérica (115) y en Panamá (50). La encuesta realizada por investigadores de Panamá y Norteamérica en 1969 en ganado vacuno, en la frontera entre Nicaragua y Costa Rica, arrojó resultados negativos (KM Johnson, comunicación personal). Iguales resultados se obtuvieron en cochinos y vacas en abril de ese año en Méjico (34); pero ya entre julio y septiembre se detectaron anticuerpos neutralizantes

en cochinos y caballos en algunas zonas del país. Cabras lactantes y perros fueron negativos.

Aves.

Como se ha demostrado anteriormente (31, 50, 65), el virus de la EEV difiere de EEE y EEO, porque parece multiplicarse mejor en mamíferos que en pájaros. Sin embargo, el virus ha podido aislarse de un pollo y de un gallo durante la epidemia de EEV de 1962 en Venezuela (14) y en aves, mayormente migratorias, en Panamá (42, 50). También en Panamá se demostraron anticuerpos en un pollo (50). Experimentalmente se ha logrado la infección de aves salvajes por inoculación subcutánea y a través de la picada de mosquitos *A. triseriatus* infectados (29). La viremia producida, aunque mucho más baja y de menor duración que la obtenida en mamíferos, fue capaz de infectar nuevos mosquitos. La infección fue asintomática y los animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes específicos. Miller (81) observó, que pichones infectados por vía subcutánea o respiratoria desarrollaban una viremia de corta duración seguida rápidamente por la aparición de anticuerpos y resistencia a la reinfección. A pesar de que pudo ponerse de manifiesto el virus en la cavidad oral de las aves infectadas, la transmisión aérea a animales controles fue ocasional. No hubo enfermedad manifiesta ni clínica ni histológicamente. Muestras de sueros de Trinidad, Venezuela y Méjico (34, 46, 113) han dado resultados negativos en las pruebas serológicas, y en Utah, Norteamérica, de 727 aves salvajes encuestadas, sólo una reveló la presencia de anticuerpos FC con título mayor de 1:16 (129). El ave era una migratoria.

Humanos.

Estudios serológicos en humanos han determinado la presencia de anticuerpos contra el virus sin relación con epidemias, en Argentina (11), Ecuador (5, 26), Brasil (24), Colombia (51, 52, 107), Surinam (64, 132), Panamá (50), Curazao (37), Méjico (85), Guatemala, Honduras, Honduras Británica (111), y Florida (Norteamérica) (140).

La encuesta realizada en Trinidad, entre 1954 y 1958, reveló (131) que no había habido actividad del virus desde la epizootia de 1943-1944 (130); en sólo una población se encontró evidencia de infección reciente con EEV o algún virus inmunológicamente semejante, lo que sugería la existencia de un foco enzoótico. Sin embargo, hasta el presente no se han reportado casos de EEV en humanos, a pesar de que el virus ha sido aislado de mosquitos, ratones centinelas y roedores salvajes, entre 1959 y 1961 (36). Recientemente Young y Johnson demostraron (141), mediante la prueba cinética de la hemaglutinación, que los virus aislados en la selva de

Bush-Bush en Trinidad, eran idénticos a las cepas de virus Mucambo aisladas en Belém, Brasil, y diferentes al virus que ocasionó la epidemia de 1943-1944; mientras que este último es semejante a las cepas de virus aisladas en Venezuela. Estos hallazgos sugieren que la epizootia de 1943 no se originó de un foco endémico, sino que fue introducida desde Venezuela, como sospechaba Gilyard (47).

A raíz de la epidemioepizootia ocurrida en Guatemala y El Salvador a mediados de 1969, se llevó a cabo una encuesta serológica en la población humana residente en localidades dentro y fuera de la zona epizootica (60), encontrándose, como era de esperarse, una incidencia altamente significativa de individuos con anticuerpos recientes (medidos por fijación del complemento) en el área epidémica, en relación a aquellos fuera de la zona de influencia de la epizootia. Este hecho y el que se obtuviera una tasa de positividad uniforme independiente de la edad, hace pensar que estos sitios no constituyan focos enzoóticos, y que el virus haya sido introducido desde áreas cercanas de actividad viral. Ello es muy factible, ya que Scherer y col. (111), aislaron el virus de la EEV en 1967-1968, exponiendo hamsters centinelas en localidades de Guatemala, Honduras y Honduras Británica. Los autores sugieren, que de estos focos enzoóticos el virus se movilizó para originar el brote en los humanos y equinos susceptibles de las zonas vecinas.

Experiencias en Venezuela.

Cuando iniciamos nuestros experimentos, los estudios serológicos conocidos eran los de Jonkers y col. (63) en 1961, quienes encontraron evidencia de infección por EEV en adultos residentes en varias poblaciones del Edo. Monagas; y la encuesta desarrollada por Briceño Rossi (15) a raíz de la epidemia de 1962, en la que determinó la presencia de anticuerpos contra el virus, en sujetos sanos provenientes de áreas no epidémicas.

La encuesta serológica humana realizada por nosotros en el Estado Zulia en 1967 (103), cinco años después del inicio del extenso brote de 1962-1964, nos reveló que la población nacida después de aquella epidemia en el área afectada no poseía anticuerpos contra EEV (Fig 10). Pudo observarse asimismo, que la incidencia de positividad aumentaba con la edad del individuo. A fines del año siguiente, en 1968, el virus incursionó de nuevo en la Guajira venezolana (117), pudiendo constatarse que la tasa de ataque en los menores de 6 años, los susceptibles para aquella época, casi triplicó la cifra de los mayores de 6 años (Tabla 2).

Estos resultados, confirman la actividad cíclica del virus en esta zona del país, la que parece cumplirse, por término medio, cada 5 ó 6 años. Esto

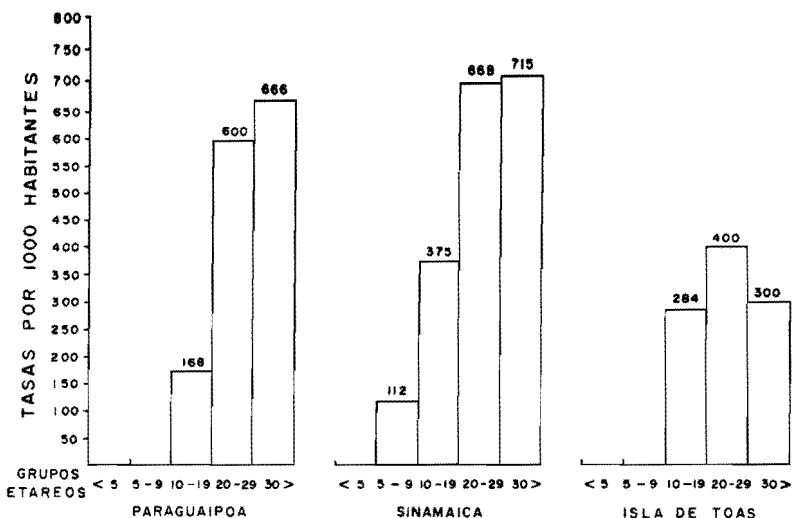


Fig 10.— Histograma basado en los resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, obtenidos en la encuesta serológica practicada en tres poblaciones situadas en la zona epidémica del Estado Zulia. Obsérvese la ausencia de positivos por debajo de los 5 años, y el aumento de la tasa en relación a la edad. (Tomado de Ryder S. y col. Invest Clín N° 39: 47-51, 1971).

TABLA 2

ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA. DISTRITO PAEZ, ESTADO ZULIA, 1968.
 DIFERENCIA EN TASAS DE MORBILIDAD ENTRE MENORES Y MAYORES DE SEIS AÑOS*

| LOCALIDAD | GRUPOS ETARIOS | |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| | MENORES DE SEIS AÑOS | MAYORES DE SEIS AÑOS |
| Municipio Guajira | | |
| casos | 420 | 533 |
| población estimada | 3.383 | 10.554 |
| tasa | 124,1 | 50,5 |
| Municipio Sinamaica | | |
| casos | 73 | 47 |
| población estimada | 1.082 | 3.377 |
| tasa | 67,5 | 13,9 |
| Distrito Páez | | |
| casos | 493 | 580 |
| población estimada | 4.465 | 13.931 |
| tasa | 110,4 | 51,6 |

* $P < 0,005.$

Tabla 2. Epidemia de encefalitis equina venezolana en el Dtto. Páez, Estado Zulia, en 1968. Obsérvese que la tasa de morbilidad en menores de 6 años, casi triplicó a la de las edades por encima de 6 años. (Tomado de Soto Escalona A y col. Invest Clín N° 31: 45-57, 1969).

está basado en lo observado por nosotros desde 1962, y dando por sentado que las epizootias reportadas por Ruiz Martínez en 1938 y 1942 (102), las de 1949-50 recopiladas por Avilán en su estudio retrospectivo (2), y los casos humanos de encefalitis observados por los epidemiólogos regionales en 1959 (LT Finol, comunicación personal), fueran todas debidas al virus de la encefalitis equina venezolana.

Es por ello, que nos sorprendió la aparición de un nuevo brote de EEV en 1969, en la misma zona noroeste del Estado Zulia, pero concentrándose el mayor número de casos en San Rafael de Mara (Fig 11), un poco más al sur que las anteriores epidemias (104). Desde 1962, no se habían reportado casos de EEV en esta población, y así pudimos observar que el porcentaje de positivos fue prácticamente semejante en todas las edades, lo cual señala que los residentes estaban uniformemente expuestos a la infección (Tabla 3).

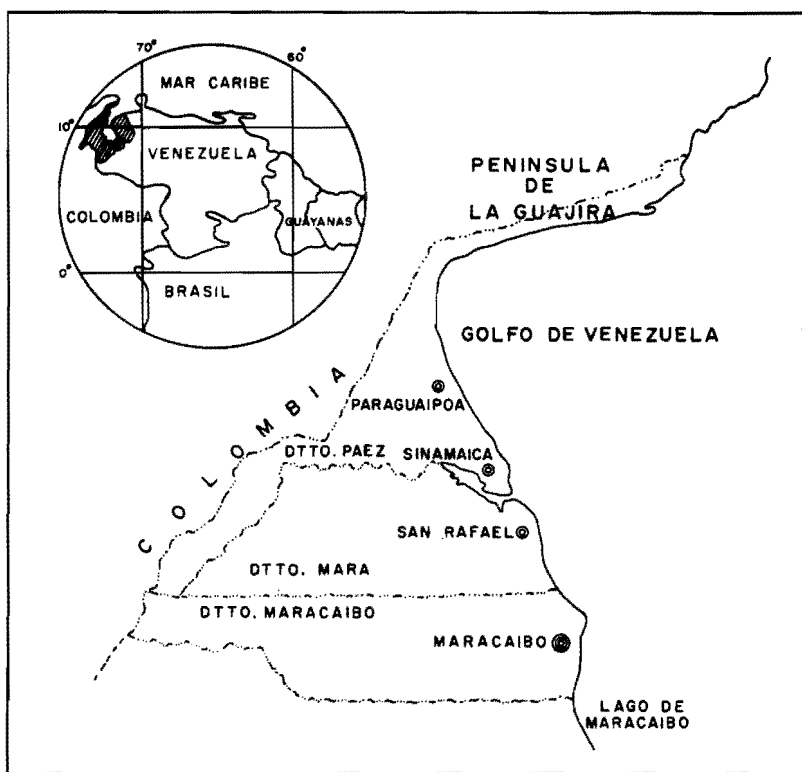


Fig 11.— Mapa de los Distritos Páez, Mara y Maracaibo, los más afectados por el brote de encefalitis equina venezolana de 1969. La población de San Rafael, capital del Dtto. Mara, acusó el mayor número de casos. (Tomado de Ryder S. y col. Invest Clín N° 39: 52-63, 1971).

TABLA 3

ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION EN PARES DE SUEROS DEL DISTRITO MARA, ESTADO ZULIA, EN 1969. POR EDADES Y SEXO.

| GRUPOS ETARIOS | VARONES | | | HEMBRAS | | | TOTAL | | |
|----------------|---------|--------|----|---------|--------|----|-------|--------|----|
| | Nº | Posit. | % | Nº | Posit. | % | Nº | Posit. | % |
| < 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 1- 5 Años | 13 | 4 | 31 | 22 | 5 | 23 | 35 | 9 | 26 |
| 6- 9 Años | 10 | 4 | 40 | 14 | 5 | 36 | 24 | 9 | 38 |
| 10-19 Años | 30 | 8 | 27 | 13 | 7 | 54 | 43 | 15 | 35 |
| 20-29 Años | 19 | 7 | 37 | 5 | 2 | 40 | 24 | 9 | 38 |
| 30 y más Años | 21 | 7 | 33 | 9 | 3 | 33 | 30 | 10 | 33 |
| TOTAL | 94 | 30 | 32 | 64 | 22 | 34 | 158 | 52 | 33 |

Tabla 3. Epidemia de encefalitis equina venezolana en el Estado Zulia, en 1969. Resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación en pares de sueros de la población de San Rafael, Dtto. Mara. Los porcentajes de positividad se distribuyeron por igual en todas las edades. (Tomado de Ryder S y col. Invest Clín N° 39: 52-63, 1971).

Este hallazgo, en contraposición a lo observado en las epidemias de la Guajira, en que la mayor tasa de ataque es en menores de 15 años (2, 117), parece demostrar que el área de San Rafael de Mara no es el asiento de un foco enzoótico, y que es más factible que éste se encuentre en zonas más cercanas a la Guajira. Nuestras investigaciones se encaminaron entonces a ubicar el área de probable actividad viral enzoótica.

Resultados en animales. En 1963, Sellers y col. (113) reportaron el hallazgo de anticuerpos en una rata en el área de la Guajira. Las ratas estudiadas por nosotros en 1970 en la misma zona (Fig 12), no poseían anticuerpos detectables en la prueba de IH (Tabla 4). Sin embargo, capturas hechas en 1971 demostraron la presencia de anticuerpos contra EEV en cuatro especies de animales salvajes: Proechimys (rata casiragua), Didelphis (rabipelado), Tupinambis (mato real) y Ameiva (isure) (O. Suárez, resultados no publicados). Siendo algunas de estas especies incriminadas como responsables del mantenimiento del ciclo enzoótico (50, 65), es importante intensificar su estudio en la zona que estamos examinando.

Sellers y col. (113) encontraron también, que una alta proporción de ovinos y caprinos de la Guajira poseían anticuerpos. En vista de la abundancia de este tipo de animal en la zona, ellos sugieren, que pudieran haber actuado como huéspedes amplificadores del virus durante la

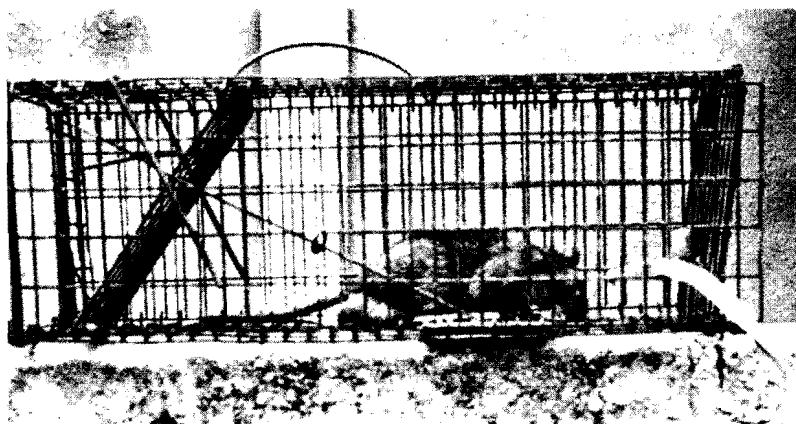


Fig 12.- Rata casiragua (*Proechimys*) capturada en el Dtto. Páez, Estado Zulia.

TABLA 4
 ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA. ANTICUERPOS INHIBIDORES
 DE LA HEMAGLUTINACION EN ANIMALES

| ESPECIES | LOCALIDAD | |
|---------------|--------------------|---------------------|
| | DTTO. MARA (1969)* | DTTO. PAEZ (1970)** |
| CABRAS | | |
| Muestras | 149 | 173 |
| Positivos | 131 | 75 |
| OVEJAS | | |
| Muestras | — | 21 |
| Positivos | — | 17 |
| RATAS | | |
| Muestra | — | 14 |
| Positivos | — | 0 |
| BURROS | | |
| Muestra | — | 6 |
| Positivos | — | 6 |

* La Rosita, Jején, Los Mayales.

** Guarero, Mali-Mai

Tabla 4. Resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación en sueros de animales domésticos y salvajes, capturados en los Dttos. Mara y Páez, entre 1969 y 1970.

epidemia de 1962. No fue sino hasta el brote de EEV de 1969 que se reportaron por primera vez en Venezuela, muertes de cabras en la población de San Rafael. Tuvimos la oportunidad de observar algunas aparentemente enfermas, a una de las cuales se le extrajo sangre pero no pudo aislarse el virus (Fig 13). En comunicación personal del Laboratorio Nacional de Salud de Bogotá, Colombia, nos informaron de una situación similar en el lado colombiano de la Península de la Guajira a fines de 1969, y el aislamiento por primera vez del virus, a partir del cerebro de un carnero joven.



Fig 13.— Cabra, aparentemente enferma, en San Rafael, Dtto. Mara, en 1969. No fue posible aislar el virus del suero de este animal.

La encuesta serológica practicada por nosotros en el Dtto. Mara en 1969, y en Guarero y Mali-Mai (Guajira venezolana) en 1970, nos evidenció un alto grado de positividad en ovinos y caprinos en la prueba IH (Tabla 4). Es posible que estos animales, como sugieren Sellers y col. (113) jueguen, al igual que el hombre y el equino, un papel importante como diseminadores del virus durante una epidemia. Sin embargo, experimentos de transmisión llevados a cabo por O. Suárez en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas utilizando algunas especies de mosquitos, han resultado infructuosos.

Resultados en humanos. En abril de 1971, practicamos una encuesta serológica en Sinamaica, en escolares entre 7 y 18 años, para determinar la incidencia de anticuerpos contra EEV en la población joven. Escogimos a Sinamaica (Fig 14), debido a su alto grado de positividad en la encuesta hecha por nosotros en 1967 (103) y a que, ecológicamente, parece haber más probabilidades de encontrar el foco enzoótico en sus cercanías. La gran cantidad de lagunas de agua fresca y salobre, más vegetación que en la zona árida de la Guajira, mayor concentración de habitantes por área, y el

hecho de haberse capturado una especie de *Culex (melanoconion)* en las investigaciones posteriores a 1962 (O. Suárez, comunicación personal), fueron los principales motivos de nuestra escogencia. La encuesta reveló que sólo el 18% de la muestra estudiada, poseía anticuerpos IH contra EEV con títulos de 1:80 ó mayores (Tabla 5).

TABLA 5
 ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
 RESULTADOS PARCIALES DE LA ENCUESTA SEROLOGICA HUMANA
 REALIZADA EN 1971.

| LOCALIDAD | MUESTRA | POSITIVOS* | PORCENTAJE |
|---------------------|---------|------------|------------|
| Sinamaica | 207 | 38 | 18 |
| Laguna de Sinamaica | 163 | 41 | 25 |
| Laguna de Catanejo | 38 | 12 | 32 |

* Títulos inhibidores de la hemaglutinación de 1:80 ó mayores.

Tabla 5. Resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación en sueros humanos, colectados en Sinamaica, Dtto. Páez, y caseríos vecinos, en 1971.

Encuestamos seguidamente a un grupo de escolares de la Laguna de Sinamaica, caserío construido sobre estacas en las aguas de una laguna, a escasos 4 kms al suroeste de la población de Sinamaica (Figs 14 y 15). Esta laguna es de aguas salobres y la vegetación de sus orillas está constituida por manglares, interrumpidos en trechos por zonas más altas que el hombre ha transformado en cocotales. Sus habitantes niegan haber tenido casos de EEV, a pesar de la cercanía con las zonas epidémicas. Encontramos que, sin embargo, un 25% de los escolares encuestados poseían anticuerpos IH contra EEV (Tabla 5). Estos residían tanto en las casas de la Laguna como en los pequeños caseríos situados en las márgenes de ella. De 11 niños de 7 años, los de menor edad encuestados, 4 poseían anticuerpos con títulos de 1:80 y más. Así que probablemente estos individuos hayan adquirido sus anticuerpos en su misma habitación o en zonas muy cercanas a su domicilio.

Pero, el *Culex (melanoconion)*, probable vector enzoótico de la EEV, se desarrolla mejor en aguas frescas que en las salobres (KM Johnson, comunicación personal), y especialmente debajo de las hojas de una planta acuática denominada "pistia" (Fig 16). Si bien encontramos pequeñas colecciones de esta planta en Caño Morita y en la Laguna de Sinamaica (probablemente llevadas allí por la corriente del río), la mayor colección

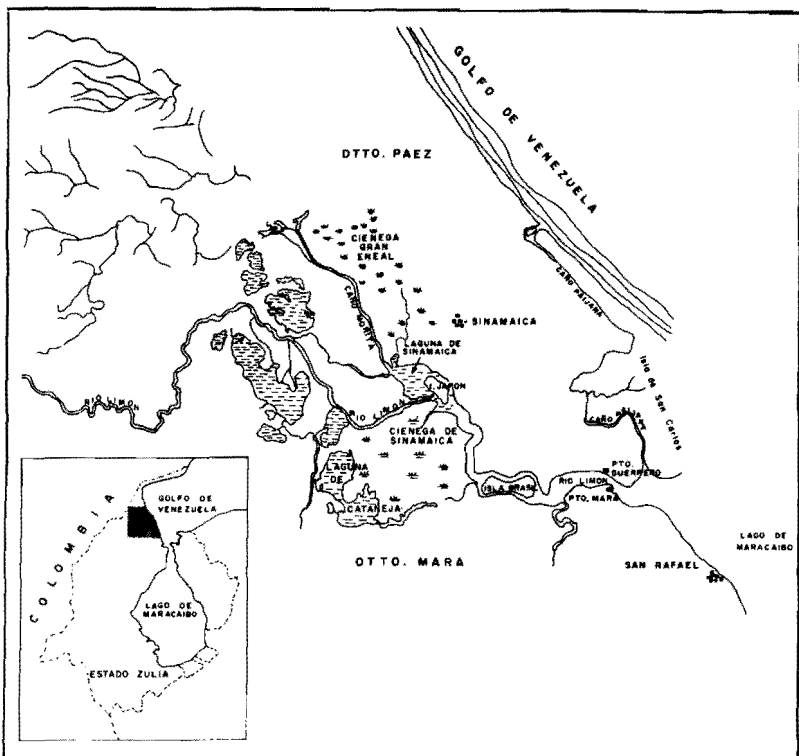


Fig 14.— Mapa en el que se demuestra la situación de Sinamaica. Obsérvese la gran cantidad de lagunas, ciénagas y caños, que existen al suroeste de la población.



Fig 15.— Laguna de Sinamaica, Dtto. Páez del Estado Zulia. Las casas se levantan sobre horcones dentro del agua. Muchos caseríos se encuentran rodeando sus márgenes. Al fondo se observa la vegetación predominante, constituida por manglares y cocoteros.

de "pistia" la encontramos en la laguna llamada de Cataneja (Fig 14), al suroeste de la Laguna de Sinamaica, en tal cantidad que en ocasiones obstruía el paso del bote (Fig 17). Diversas plantas acuáticas y pequeñas islas de "enea" llenaban la laguna; garzas blancas y otras aves acuáticas viven allí, y en tierra firme alcanzamos a ver chozas y ganado vacuno.



Fig 16.— Planta acuática conocida como "pistia". Crece abundantemente en las lagunas que describimos en la figura 14. Se ha encontrado que varias especies de *Culex* (melanoconion) se desarrollan en el agua, bajo sus hojas.

En el caserío denominado Cataneja, en las orillas de la laguna, se estudiaron 38 individuos con edades comprendidas entre 7 y 60 años, obteniéndose 12 positivos (Tabla 5), el menor de los cuales tenía 9 años, y cuyos títulos IH eran todos superiores a 1:320. Seis de ellos estuvieron por encima de 1:1280. Los habitantes refirieron haber tenido recientemente cuadros febriles, especialmente los niños.

Discusión. La experiencia acumulada parece señalar que los alrededores de la Laguna de Cataneja, y probablemente otras cercanas lagunas de agua fresca, podrían ser propicios para el establecimiento del foco enzoótico del



Fig 17.— Laguna de Cataneja. Obsérvese la gran cantidad de "pistia" que cubre la superficie del agua. Se ven, además, islas de "enea" y otros tipos de plantas acuáticas: y garzas blancas.

virus de la EEV. La alta densidad de "pistia" (favorecedora del desarrollo del mosquito), y los títulos significativos de anticuerpos en la población de sus márgenes, superiores a los demás sitios estudiados, son dos factores importantes para tal afirmación. El reporte de enfermedades febriles en niños en época no epidémica es muy sugestivo. Hemos estado capturando roedores y exponiendo hamsters en la zona, y aunque no se ha aislado el agente hasta ahora, se ha logrado identificar al *Culex (melanoconion) aikenii*, del cual se ha aislado el virus en Panamá. (O Suárez, comunicación personal).

Un dato que es conveniente destacar es la gran cantidad de garzas y otras aves acuáticas halladas en esta laguna. Si bien se ha venido sosteniendo que las aves no constituyen factor esencial en la epidemiología de la EEV (29), es bueno señalar que se ha aislado el virus de aves migratorias en Panamá (42, 50). Es posible, que en estas áreas los mosquitos utilicen las aves acuáticas en vez de los roedores, como fuente principal de alimentación sanguínea.

Otro punto de interés lo constituiría la determinación de la tasa crítica de protección de la población, para que se desencadene un nuevo brote. En 1967 encontramos que en Paraguaipoa, el 31% de la población encuestada, poseía anticuerpos contra EEV (103), y al año siguiente se produjo una epidemia (117). Si en abril de 1971 hallamos que en Sinamaica la tasa de positividad en los menores de 18 años apenas alcanzó al 18%, podríamos sospechar que nos encontramos frente a una cifra crítica. Sólo se

necesitaría que se dieran las otras condiciones (período prolongado de lluvias, pico de viremia en roedores, presencia de vectores epidémicos), para que se desencadenara una epidemia. Los equinos, que son una población mas estable que la humana, podrían ser utilizados mejor como indicadores; una encuesta anual, determinaría la densidad crítica de susceptibles para que ocurra una epizootia. Esta hipótesis es muy práctica y su efectividad se puso de manifiesto durante la epidemioepizootia de EEV en Costa Rica en 1970. En 1969 un grupo de investigadores, preocupados por el desplazamiento del virus en Centroamérica, practicó una encuesta serológica en la población equina de una provincia al norte de Costa Rica, en la frontera con Nicaragua, encontrando que el 100% era susceptible al virus; a mediados de 1970 hizo su aparición el brote en una provincia limítrofe. Las pruebas serológicas efectuadas determinaron que era la misma cepa antigénica aislada en 1969 en Guatemala y Honduras, lo que confirmó la extensión de la epizootia (KM Johnson, comunicación personal).

No creemos que sea necesario que se llegue a un 100% de susceptibilidad para producir una nueva incursión del virus, pero tampoco estaremos de acuerdo con Kissling y Chamberlain (67) quienes afirmaron en 1967 que, debido a la longevidad y tasa de reemplazamiento lento de los equinos, las epizootias sólo deberían sucederse una vez cada 10 años. La historia desde entonces, nos ha dado pruebas de lo contrario.

Como ha podido observarse en los tópicos expuestos en este capítulo, si bien el virus ha podido aislarse en diferentes regiones del mundo, las condiciones intrínsecas de su habitat, huéspedes y vectores, aparición de epidemioepizootias, y aún virulencia, varían considerablemente. Nuestro trabajo intenta dilucidar las complejas circunstancias que inciden en la aparición de los periódicos brotes de la enfermedad en esta región del país, y por ende, su control por métodos racionales.

CONTROL

El control de la enfermedad puede ser enfocado desde diversos puntos de vista: a) eliminación del artrópodo vector; b) lucha contra el huésped intermedio; c) protección del hombre y del equino.

La lucha contra los mosquitos **vectores** es una de las mas efectivas medidas en el control de la diseminación de la enfermedad, tal como fuera demostrado por Salterini durante la epidemia de 1962 en la Guajira venezolana (105). Es lógico suponer que los mosquitos domésticos y peridomésticos pueden combatirse con más eficacia que las especies de distribución y hábitos principalmente rurales o selváticos; a pesar de ello, sí es posible la lucha si se ataca a los transmisores (Fig 18).



Fig 18.— Unidad (tifa) de la División de Endemias Rurales, Malariología, nebulizando una mezcla de malathion en gas-oil, para eliminar los vectores durante una epidemia de encefalitis equina venezolana.

En las arbovirosis zoonóticas, la eliminación total del huésped intermedio en una zona determinada, debería dar lugar a la desaparición del vector, del virus, o de ambos, pero las dificultades son evidentes. Cuando se trata de regiones muy extensas, resulta difícil reducir o limitar su número. En otros casos habrá varias especies que sirvan de huéspedes al virus y la eliminación de una sola apenas influirá en el ciclo natural. La lucha contra los pequeños mamíferos que viven en el suelo de los bosques, plantea un problema complicado. En primer lugar hay que crear condiciones desfavorables para la vida de estos animales en los núcleos de población, permanentes o provisionales y, en segundo lugar, ha de organizarse la eliminación de los mismos por medios químicos o mecánicos en los focos selváticos usando trampas y cebos envenenados. Sin embargo, estos métodos se encuentran aún en fase experimental (97).

Desde 1939 se ha venido usando en Venezuela una vacuna preparada en embrión de pollo e inactivada con formalina para la inmunización de los equinos (71). Randall y col. en 1949 (99) reportan el uso de una vacuna formalinizada preparada en embriones de pollo y parcialmente purificada por ultracentrifugación, para inmunización del personal del laboratorio, con resultados satisfactorios. En 1952 Maurer y col. (78) desarrollaron una vacuna trivalente (EEV, EEE, EEO). Sin embargo, estas vacunas aparentemente contenían virus activos, ya que un número significativo de individuos inmunizados con ellas desarrollaron síntomas de la enfermedad y en algunos casos fue posible aislar el virus (125). Basándose en los trabajos de Berge y col. (9), quienes lograron la alteración de la virulencia de EEE por pasajes en cultivos de células de corazón de cobayo, Gochenour y col. (49) y McKinney y col. (79) han logrado obtener una sólida inmunidad en burros y personal de laboratorio, inmunizados con la

vacuna viva atenuada. Esta vacuna experimental es usada en Norteamérica para proteger al personal de laboratorio que se encuentra en grave riesgo de contraer la enfermedad debido a su tipo de trabajo.

Para Sudia y col. (123) el control más efectivo es la vacunación de equinos susceptibles, con lo que se previene que ellos sirvan como fuentes de infección para mosquitos que se alimentan de sangre de humanos y equinos. Experimentalmente se ha demostrado (59), que los caballos inoculados con la cepa de EEV utilizada para la vacunación de equinos (TC-83 de Fort Detrick), a pesar de provenir originalmente de la altamente virulenta cepa de Trinidad, producía viremias de muy bajo título en los animales inmunizados, y estos animales eran incapaces de infectar mosquitos (123). Aún mas, si se inyectaban estos animales inmunes con una cepa virulenta de EEV, como la aislada en Guatemala en 1969, no desarrollaban viremia (59). Todo ésto habla en favor del control de la enfermedad por la vacunación de los equinos ya que, además de la protección, no hay el riesgo de producir viremias altas que ocasionalmente podrían servir como fuente de infección para nuevos mosquitos. La efectividad de esta vacuna se puso de manifiesto recientemente cuando, al ser administrada a caballos susceptibles durante el brote de EEV ocurrido en Costa Rica en 1970, detuvo la mortalidad de equinos a los 8 días después de la vacunación masiva (KM Johnson, comunicación personal).

Desde 1959, Negrette (90) propone la utilización de tetraciclinas para el tratamiento de las enfermedades a virus, incluyendo la EEV. En 1969 publica una comunicación preliminar (95) sobre el efecto de la tetraciclina en la infección experimental del ratón con el virus de la EEV, y en la que demuestra, que los animales inyectados con virus más tetraciclina sobrevivían a los controles no tratados con el antibiótico, en el 47% de los casos.

Debido a la posibilidad de la transmisión por contacto y de que los equinos y humanos pueden servir como fuente de infección, se recomienda el aislamiento del enfermo y su protección contra la picadura de mosquitos.

RESUMEN

El virus de la encefalitis equina venezolana ha venido causando brotes periódicos de la enfermedad en el área de la Guajira venezolana desde 1930. El presente trabajo resume las investigaciones epidemiológicas realizadas desde 1962 en esta zona del país, en un intento de localizar el foco enzoótico de la enfermedad.

Si bien la Península de la Guajira es una región desértica, de vegetación xerófila, posee muchas lagunas de aguas salobres cubiertas de "pistia",

planta acuática bajo cuyas hojas se ha demostrado la multiplicación del *Culex (melanoconion)*, probable vector enzoótico. A este respecto, en las capturas de mosquitos practicadas en el área en estudio, hemos logrado identificar al *Culex (melanoconion) aikenii*, del que se ha aislado el virus en Panamá.

Aunque los esfuerzos para aislar el agente durante los períodos interepidémicos han sido infructuosos hasta la fecha, se ha podido detectar la presencia de anticuerpos en cuatro especies de animales salvajes: *Proechymis*, *Tupinambis*, *Didelphis* y *Ameiva*, el primero de los cuales ha sido demostrado previamente como reservorio del virus.

Parece, por tanto, que están dadas las condiciones para el establecimiento del foco enzoótico del virus en la región, y que será cuestión de tiempo lograr el aislamiento del agente. Una vez conocidos los factores que intervienen en el ciclo enzoótico del virus, se podrá intentar un control más racional de la enfermedad.

Venezuelan equine encephalitis. Epidemiological aspects of the disease in the Venezuelan Guajira. 1962-1971.

Ryder S (Instituto de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela). *Invest Clín* 13 (3): 91-141, 1972.- The virus of the Venezuelan equine encephalitis has caused periodic outbreaks of the disease in the Venezuelan Guajira area since 1930. The present paper summarizes the epidemiologic investigations carried out since 1962 in this region of the country, to locate the enzootic focus of the disease.

Although the Guajira Peninsula is a desertic region, with xerophil vegetation it possesses many lakes of saltish waters covered with "pistia", an aquatic plant under which leaves has been demonstrated the multiplication of the *Culex (melanoconion)*, a probable enzootic vector. We have identified the *Culex (melanoconion) aikenii* from which the virus has been isolated in Panama.

Up to now the efforts to isolate the agent during the interepidemic periods have been unsuccessful. However we have been able to detect the presence of antibodies in four species of wild animals: *Proechymis*, *Tupinambis*, *Didelphis* and *Ameiva*, the first of which has been demonstrated previously as reservoir of the virus. It seems, therefore, that the conditions are given for the establishment of the enzootic focus of the virus in the region, and that it would be a question of time to achieve the isolation of the agent. Thus knowing the factors that intervene in the enzootic cycle of the virus, a more reasonable control of the disease will be able to be attempted.

Este trabajo de investigación epidemiológica es posible gracias a la magnífica colaboración de las Instituciones y personas que se mencionan a continuación:

- Instituto de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia: Dres. Américo y Negrette y Armando Soto Escalona; Bio. Hugo Hernández. Sres. Germán Serrano, Florencio Añez y Pedro Rangel.
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), que financia en parte el proyecto.
- Dirección de Malariología, División de Endemias Rurales: Dres. Lacerio Guerrero, Ismael Silva, Octavio Suárez, Hernando Rubiano, Valentina Vitols y Andrés Sucre. Sres. Rafael Silva, Luis Briceño, Jaime Flores, Exeario Márquez, Félix Ballesteros, Sósimo Viloria, Domingo Morales, Gregorio Ulloa, Ramón Urbano y Ramiro Méndez.
- Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC): Dr. G.H. Bergold. Bio. Concepción de Decena, Srta. Carmen Lucía Sequera, Bio. Pilar de Millán y Josefina de Robaina; Sres. Leslie Baute y Andrés Rivas.
- Servicio Cooperativo de Salud del Estado Zulia: Dr. Luis T. Finol y Personal Técnico de Estadística del Servicio Cooperativo. Médicos Jefes y personal médico y paramédico de las Medicaturas Rurales de los Dttos. Mara y Páez, Estado Zulia.
- Directores y maestros de las Escuelas Nacionales, Estadales y Municipales del Dtto. Páez, Estado Zulia.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la Srta. Marina Medrano, por su excelente labor secretarial; al Sr. Eduardo Añez, por la reproducción del material fotográfico, y al Sr. Aurelio Bohórquez, por la confección de los dibujos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ALEVIZATOS AC, MCKINNEY RW y FEIGIN RD: Live, attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 16: 762-768, 1967.
- 2— AVILAN J: El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. *Rev Viana SAS* 29: 231-321, 1964.
- 3— AVILAN J: Los brotes de EEV en Venezuela durante 1962 a 1964. *Rev Viana SAS* 31: 787-805, 1966.

- 4- BAQUERIZO L y MARMOL F: Encefalitis a virus transmitidos por artrópodos. II. Confirmación serológica de un caso humano tipo venezolano. *Rev Ecuator Hig Med Trop* 15: 154-162, 1958.
- 5- BAQUERIZO L y MARMOL F: Encefalitis a virus transmitidos por artrópodos. IV. Investigación del tipo venezolano en algunos sueros humanos en la costa ecuatoriana. *Rev Ecuator Hig Med Trop* 15: 217-224, 1958.
- 6- BAQUERIZO L y MARMOL F: Aislamiento del virus de la encefalomiелitis equina tipo venezolano del suero sanguíneo y faringe de un caso humano. *Rev Ecuator Hig Med Trop* 16: 1-8, 1959.
- 7- BECK CE y WYCKOFF RWG: Venezuelan equine encephalomyelitis. *Science* 88: 530, 1938.
- 8- BERGE TO, GLEISER Ch A, GOCHENOUR Jr WS, MIESSE M y TIGERTT WD: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. II. Modification by specific immune serum of response of central nervous system of mice. *J Immunol* 87: 509-517, 1961.
- 9- BERGE TO, BANKS IS y TIGERTT WD: Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea pig heart cells. *Am J Hyg* 73: 209-218, 1961.
- 10- BERMUDEZ R: Encefalomiелitis equina venezolana y sus secuelas. Tesis Doctoral. Universidad del Zulia. 1967.
- 11- BETTINOTTI CM: Incidencia de anticuerpos fijadores del complemento para virus de encefalitis (cuatro especies diferentes) en la población general de Córdoba. *La Semana Médica (Buenos Aires)* 110: 393-399, 1957.
- 12- BRICEÑO-ROSSI AL: Aislamiento y frecuencia del virus encefalítico venezolano en la sangre y encéfalo de casos humanos estudiados durante la epidemia noviembre-diciembre 1962 y enero-octubre 1963. *Rev Viana SAS* 29: 354-392, 1964.
- 13- BRICEÑO-ROSSI AL: La frecuencia del virus EEV en el exudado faríngeo de casos clínicos de encefalitis. *Rev Viana SAS* 29: 393-409, 1964.
- 14- BRICEÑO-ROSSI AL: Estudios del virus encefalomiелítico equino venezolano. La búsqueda y el estudio del virus en las aves del país. *Rev Viana SAS* 29: 432-437, 1964.

- 15- BRICEÑO-ROSSI AL, SEQUERA CL y SEGURA-DIAZ H: Estudio inmunológico de la encefalitis equina venezolana y de su distribución geográfica en Venezuela. *Rev Vlana SAS* 29: 438-456, 1964.
- 16- BYKOVSKY AF, YERSHOV FI y ZHDANOV VM: Morphogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol* 4: 496-504, 1969.
- 17- BYRNE RJ, FRENCH GR, YANCEY FS, GOCHENOUR WS, RUSSELL PK, RAMSBURG H, BRAND OA, SCHEIDER FG y BUESCHER E: Clinical and immunological interrelationship among Venezuelan, Eastern, and Western equine encephalomyelitis viruses in burros. *Am J Vet Res* 25: 24-31, 1964.
- 18- CARPIO F, MUSSGAY M y SATURNO A: Cuatro casos humanos de infección por el virus de la encefalitis equina venezolana. *Acta Cient Vlana* 13: 90-93, 1962.
- 19- CASALS J, CURNEN EC y THOMAS L: Venezuelan equine encephalomyelitis in man. *J Exptl Med* 77: 521-530, 1943.
- 20- CASALS J: Viruses: the versatile parasites. I. The arthropod-borne group of animal viruses. *Trans NY Acad Sci* 19: 219-235, 1957.
- 21- CASALS J: Procedures for identification of arthropodborne viruses. *Bull Wld Hlth Org* 24: 723-734, 1961.
- 22- CASTILLO CE: Estudio clínico de la encefalitis equina. *Rev Vlana SAS* 31: 889-897, 1966.
- 23- CAUSEY OR, CAUSEY CE y MAROJA OM: Nota sobre o isolamento de virus neurotrópicos transmitidos por artrópodos na região amazonica. *Rev Serv Esp Saúde Pub* 9: 223-229, 1957.
- 24- CAUSEY OT y THEILER M: Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon Valley in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 7: 36-41, 1958.
- 25- CAUSEY OR, CAUSEY CE, MAROJA OM y MACEDO DG: The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 10: 227-249, 1961.
- 26- CORONEL-SALMON A: Investigación de anticuerpos para encéfalo-mielitis venezolana por la prueba de seroneutralización. *Rev Ecuador Hig Med Trop* 17: 71-95, 1960.
- 27- CORRISTAN EC, LA MOTTE Jr LC y SMITH DG: Susceptibility of bats to certain encephalitis viruses. *Fed Proc* 15: 584, 1956.

- 28-CHAMBERLAIN RW, SIKES RK y NELSON DB: Infection of *Mansonia perturbans* and *Psorophora ferox* mosquitoes with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. PSEBM 91: 215-216, 1955.
- 29-CHAMBERLAIN RW, KISSLING RE, STAMM DD, NELSON DB y SIKES RK: Venezuelan equine encephalomyelitis in wild birds. Am J Hyg 63: 261-273, 1956.
- 30-CHAMBERLAIN RW, SUDIA WD, COLEMAN PH y WORK TH: Venezuelan equine encephalitis virus from South Florida. Science 145: 272-274, 1964.
- 31-CHAMBERLAIN RW, SUDIA WD, WORK TH, COLEMAN PH, NEWHOUSE VF, JOHNSTON Jr JG: Arbovirus studies in South Florida, with emphasis on Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Am J Epidemiol 89: 197-210, 1969.
- 32-CHAPPELL WA, SASSO DR, TOOLE RF y MONATH TP: Labile serum factor and its effect on arbovirus neutralization. App Microbiol 21: 79-83, 1971.
- 33-DAVIS MH, HOGGE Jr AL, CORRISTAN EC y FERRELL JF: Mosquito transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus from experimentally infected dogs. Am J Trop Med Hyg 15: 227-230, 1966.
- 34-DICKERMAN RW, ZARATE ML, SCHERER WF y MUCHA-MACIAS J: Venezuelan encephalitis virus along the central and northern gulf coast of Mexico as of July-September 1969. Bol Of Sanit Panam 71: 143-151, 1971.
- 35-DOMINGUEZ A: Estudio neuroanatomopatológico en la encefalitis equina venezolana. Comunicación preliminar. Invest Clín 4(6): 7-10, 1963.
- 36-DOWNS HG, SPENCE L y AITKEN THG: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis in Trinidad, W.I. III. Reisolation of virus. Am J Trop Med Hyg 11: 841-843, 1962.
- 37-DOWNS WG, SPENCE L y BORGHANS JGA: Arthropodborne encephalitis viruses in the West Indies area. V. A serological survey of Curacao, NW.I. Trop geogr Med 15: 237-242, 1963.
- 38-EARLEY E, PERALTA PH y JOHNSON KM: A plaque neutralization method for arboviruses. PSEBM 125: 741-747, 1967.
- 39-EHRENKRANZ NJ, SINCLAIR MC, BUFF E y LYMAN DO: The natural occurrence of Venezuelan equine encephalitis in the United

States. First case and epidemiologic investigations. *New Eng J Med* 282: 298-302, 1970.

- 40- FEIGIN RD, JAEGER RF, MCKINNEY RW y ALEVIZATOS AC: Live, attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine. II. Whole-blood amino-acid and fluorescent-antibody studies following immunization. *Am J Trop Med Hyg* 16: 769-777, 1967.
- 41- FRANCK PT y JOHNSON KM: An outbreak of Venezuelan encephalitis in man in the Panamá Canal Zone. *Am J Trop Med Hyg* 19: 860-865, 1970.
- 42- GALINDO P, SRIHONGSE S, DE RODANICHE E y GRAYSON E: An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panamá, 1959-1962. *Am J Trop Med Hyg* 15: 385-400, 1966.
- 43- GALLIA F y KUBES V: Neutralization of the Venezuelan encephalomyelitis virus by human serums. *JAMA* 125: 894-897, 1944.
- 44- GARCIA TAMAYO J: Desarrollo del virus de la encefalitis equina venezolana en el tejido nervioso de ratones recién nacidos. Ultraestructura e histoquímica. *Invest Clín* 12(37): 7-63, 1971.
- 45- GARMAN JL, SCHERER WF y DICKERMAN RW: A study of equine virulence of naturally occurring Venezuelan encephalitis virus in Veracruz with description of antibody responses. *Bol Of Sanit Panam* 65: 238-252, 1968.
- 46- GILYARD RT: A clinical study of Venezuelan virus equine encephalomyelitis in Trinidad, B.W.I. *J Am Vet Med Ass* 106: 267-277, 1945.
- 47- GILYARD RT: Mosquito transmission of Venezuelan virus equine encephalomyelitis in Trinidad. *Bull US Army Med Dept* 75: 96-107, 1944.
- 48- GLEISER CH, GOCHENOUR Jr WS, BERGE TO y TIGERTT WD: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. I. Modification by cortisone of the response of the central nervous system of *Macaca mulatta*. *J Immunol* 87: 504-508, 1961.
- 49- GOCHENOUR Jr WS, BERGE TO, GLEISER CA y TIGERTT WD: Immunization of burros with living Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Hyg* 75: 351-362, 1962.
- 50- GRAYSON MA y GALINDO P: Epidemiologic studies of Venezuelan equine encephalitis virus in Almirante, Panamá. *Am J Epidemiol* 88: 80-96, 1968.

- 51—GROOT H: Notas sobre la frecuencia de la infección humana por el virus de la encefalitis equina venezolana en Colombia. *Rev Univ Los Andes* 1: 133-135, 1958.
- 52—GROOT H: Estudios sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc Ex Fis Nat* 12: 197-217, 1964.
- 53—GRUBER J: Purification, concentration, and inactivation of Venezuelan equine encephalitis virus. *App Microbiol* 20: 427-432, 1970.
- 54—HAHON N y COOKE KO: Primary virus-cell interactions in the immunofluorescence assay of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol* 1: 317-326, 1967.
- 55—HAHON N: Cell surface antigen induced by Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Infect Immun* 2: 713-715, 1970.
- 56—HAYES SA: A case of equine encephalitis of Venezuelan type in a human being. *Carib Med J* 6: 55-56, 1944.
- 57—HEARN Jr HJ y DAWSON FW: Comparative effects of betapropiolactone on mice, mouse-derived cell cultures, and Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *App Microbiol* 9: 278-282, 1961.
- 58—HEARN Jr HJ: Cross-protection between Venezuelan equine encephalomyelitis and Eastern equine encephalomyelitis virus. *PSEBM* 107: 607-610, 1961.
- 59—HENDERSON BE, CHAPPELL WA, JOHNSTON Jr JG y SUDIA WD: Experimental infection of horses with three strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. I. Clinical and virological studies. *Am J Epidemiol* 93: 194-205, 1971.
- 60—HINMAN AR, MCGOWAN Jr JE y HENDERSON BE: Venezuelan equine encephalomyelitis: surveys of human illness during an epizootic in Guatemala and El Salvador. *Am J Epidemiol* 93: 130-136, 1971.
- 61—HORZINEK M y MUNZ K: Structural constituents of Venezuelan equine encephalitis virus. *Arch f ges Virusforsch* 27: 94-108, 1969.
- 62—JOHNSON KM, SHELOKOV A, PÉRALTA PH, DAMMIN GJ y YOUNG NA: Recovery of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in Panamá. A fatal case in man. *Am J Trop Med Hyg* 17: 432-440, 1968.
- 63—JONKERS AH, DOWNS WG, SPENCE L y AITKEN THG: Arthropod-borne encephalitis viruses in northeastern South America.

- II. A serological survey of northeastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 14: 304-308, 1965.
- 64— JONKERS AH, SPENCE L y KARBAAT J: Arbovirus infections in Dutch military personnel stationed in Surinam. Further studies. *Trop geogr Med* 20: 251-256, 1968.
- 65— JONKERS AH, SPENCE L, DOWNS WG, AITKEN THG y WORTH CB: Arbovirus studies in Bush-Bush Forest, Trinidad, W.I. September 1959-December 1964. VI. Rodent associated viruses (VEE and agents of groups C and Guama): isolation and further studies. *Am J Trop Med Hyg* 17: 285-298, 1968.
- 66— KISSLING RE, CHAMBERLAIN RW, NELSON DB y STAMM DD: Venezuelan equine encephalomyelitis in horses. *Am J Hyg* 63: 274-287, 1956.
- 67— KISSLING RE y CHAMBERLAIN RW: Venezuelan equine encephalitis. *Adv Vet Sci* 11: 65-84, 1967.
- 68— KLIMENKO SM, YERSHOV FI, GOFMAN YP, NABATNIKOV AP y ZHDANOV VM: Architecture of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Virology* 27: 125-128, 1965.
- 69— KOPROWSKI H y LENNETTE EH: Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection in the developing chick embryo. *J Bacteriol* 48: 463-472, 1944.
- 70— KOPROWSKI H y LENNETTE EH: Effect of *in vitro* cultivation on pathogenicity of Venezuelan virus. *J Exptl Med* 84: 205-210, 1946.
- 71— KUBES V y RIOS FA: The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 90: 20-21, 1939.
- 72— KUBES V: Venezuelan-type equine encephalomyelitis virus in Trinidad. *Science* 99: 41-42, 1944.
- 73— KUNDIN WD, LIU Ch y RODINA P: Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. I. Infection in suckling mice. *J Immunol* 96: 39-48, 1966.
- 74— KUNDIN WD: Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. II. Infection in young adult mice. *J Immunol* 96: 49-58, 1966.
- 75— LENNETTE EH y KOPROWSKI H: Human infection with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. A report on eight cases of infection acquired in the laboratory. *JAMA* 123: 1088-1095, 1943.

- 76-- LENNETTE EH y SCHMIDT NJ: Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. American Public Health Association, Inc. Fourth edition. New York, 1969.
- 77-- LEVI CASTILLO R: The problem of human and equine encephalomyelitis in Ecuador. *Acta Trop* 9: 77-80, 1952.
- 78-- MAURER FD, KUTTLER KL, YAGER RH y WARNER A: Immunization of laboratory workers with purified trivalent equine encephalomyelitis vaccine. *J Immunol* 68: 109-114, 1952.
- 79-- MCKINNEY RE, BERGE TO, SAWYER WD, TIGERTT WD y CROZIER D: Use of an attenuated strain of Venezuelan equine encephalomyelitis virus for immunization in man. *Am J Trop Med Hyg* 12: 597-603, 1963.
- 80-- METZGER JF, BANKS IS, SMITH CHW y HOGGAN MD: Demonstration of Venezuelan equine encephalomyelitis in tissue culture by immunofluorescence. *PSEBM* 106: 212-214, 1961.
- 81-- MILLER WS: Infection of pigeons by airborne Venezuelan equine encephalitis virus. *Bacteriol Rev* 30: 589-595, 1966.
- 82-- MIMS CA, DAY MF y MARSHALL ID: Cytopathic effect of Semliki Forest virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 15: 775-784, 1966.
- 83-- MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. Venezuelan equine encephalitis. Vol 20: N° 27 y 35, 1971.
- 84-- MUCHA-MACIAS J: Infecciones por virus arbor. Estudios realizados en el Instituto Nacional de Virología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. *Gac Med México* 93: 415-420, 1963.
- 85-- MUCHA-MACIAS J, SANCHEZ-SPINDOLA I y CAMPILLO-SAINZ C: Venezuelan equine encephalomyelitis antibodies in human beings of southeastern México. *Am J Trop Med Hyg* 15: 364-368, 1966.
- 86-- MUCHA-MACIAS J y MORRILLA-GONZALEZ A: Encefalitis equina de Venezuela. Estudio de una cepa aislada en México. *Rev Invest Salud Pub (Mex)* 27: 85-110, 1967.
- 87-- MUSSGAY M: Identification of equine encephalitis viruses by a simple plaque technique. *Am J Trop Med Hyg* 11: 291-293, 1962.
- 88-- MUSSGAY M y WEIBEL J: Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in KB cells. *Virology* 16: 56-62, 1962.

- 89– MUSSGAY M y WEIBEL J: Electron microscopic demonstration of purified Venezuelan equine encephalitis virus. *Virology* 19: 109-112, 1963.
- 90– NEGRETTE A: Encefalitis epidémica. *Invest Clín* 1(1): 11-34, 1960.
- 91– NEGRETTE A: Encefalitis equina venezolana. Manifestaciones clínicas iniciales. *Invest Clín* 4(5): 51-57, 1963.
- 92– NEGRETTE A: Encefalitis equina venezolana. Fórmula leucocitaria relativa. *Invest Clín* 9(25): 53-65, 1968.
- 93– NEGRETTE A: Encefalitis equina venezolana. Leucocitos vacuolados. *Invest Clín* 9(26): 97-107, 1968.
- 94– NEGRETTE A y SULBARAN SOLIS G: Encefalitis venezolana. Cifra de leucocitos. Manifestaciones clínicas iniciales. *Invest Clín* 11(33): 11-18, 1970.
- 95– NEGRETTE A, SOTO-ESCALONA A y RYDER S: Acción de la tetraciclina sobre la encefalitis venezolana experimental. Comunicación preliminar. *Invest Clín* 11(36): 7-11, 1970.
- 96– NEGRETTE A: Restos leucocitarios en la sangre periférica de pacientes con encefalitis venezolana. *Invest Clín* 11(36): 13-20, 1970.
- 97– ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Los arbovirus y su importancia en patología humana. Informe Técnico N° 369. Ginebra, 1967.
- 98– RANDALL R y MILLS JW: Fatal encephalitis in man due to the Venezuelan virus of equine encephalomyelitis. *Science* 99: 225-226, 1944.
- 99– RANDALL R, MAURER FD y SMADEL JE: Immunization of laboratory workers with purified Venezuelan equine encephalomyelitis vaccine. *J Immunol* 63: 313-318, 1949.
- 100– REITMAN M, TRIBBLE Jr HR y GREEN L: Gamma-irradiated Venezuelan equine encephalitis vaccines. *App Microbiol* 19: 763-767, 1970.
- 101– ROBERTS ED, SANMARTIN C, PAYAN J y MACKENZIE RB: Neuropathological changes in 15 horses with naturally occurring Venezuelan equine encephalomyelitis. *Am J Vet Res* 31: 1223-1229, 1970.
- 102– RUIZ-MARTINEZ C: Encefalomyelitis equina de las Américas. *Bull l'Off Internat Epizoot* 57: 302-354, 1962.

- 103- RYDER S, FINOL LT y SOTO-ESCALONA A: Anticuerpos contra el virus de la encefalitis equina venezolana en la población humana del Estado Zulia, Venezuela, en 1967. *Invest Clín* 12(39): 31-51, 1971.
- 104- RYDER S, FINOL LT y SOTO-ESCALONA A: Encefalitis equina venezolana. Comentarios acerca de la epidemia ocurrida en el Estado Zulia, Venezuela, a fines de 1969. *Invest Clín* 12(39): 52-63, 1971.:
- 105- SALTERINI V: Epidemia de encefalitis humana producida por el virus venezolano de la encefalomiélitis equina, ocurrida en 1962 en el Edo. Zulia (Venezuela), y su control por medio de rociamiento aéreo y fumigaciones aerosólicas terrestres. *Kasmera* 2: 349-392, 1966.
- 106- SANMARTIN-BARBERI C, GROOT H y OSORNO-MESA E: Human epidemic in Colombia caused by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 3: 283-293, 1954.
- 107- SANMARTIN C y DUEÑAS A: Hemagglutination-inhibition and neutralization tests for the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 8: 346-348, 1959.
- 108- SANMARTIN C y ARBELAEZ N: Inmunidad al virus de la encefalitis venezolana en la población de la Guajira, Colombia, en abril de 1963. *Bol Of San Panam* 59: 516-525, 1965.
- 109- SANMARTIN C, TRAPIDO H, BARRETO P y LESMES CI: Isolation of Venezuelan and Eastern equine encephalomyelitis viruses from sentinel hamsters exposed in the Pacific lowlands of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 20: 469-473, 1971.
- 110- SHERER WF, DICKERMAN RW, CHIA CW, VENTURA A, MOORHOUSE A, GEIGER R y DIAZ-NAJERA A: Venezuelan equine encephalitis virus in Veracruz, México, and the use of hamsters as sentinels. *Science* 145: 274-275, 1964.
- 111- SCHERER WF, DICKERMAN RW y ORDOÑEZ JV: Discovery and geographic distribution of Venezuelan encephalitis virus in Guatemala, Honduras and British Honduras during 1965-68, and its possible movement to Central América and México. *Am J Trop Med Hyg* 19: 703-711, 1970.
- 112- SELLERS RF: The use of a line of hamster kidney cells (BHK21) for growth of arthropod-borne viruses. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 57: 433-437, 1963.

- 113-SELLERS RF, BERGOLD GH, SUAREZ OM y MORALES A: Investigations during Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela, 1962-1964. *Am J Trop Med Hyg* 14: 460-469, 1965.
- 114-SHOPE RE, CAUSEY OR, DE ANDRADE AHP y THEILER M: The Venezuelan equine encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 13: 723-727, 1964.
- 115-SIDWELL RW, GEBHARDT LP y THORPE BD: Epidemiological aspects of Venezuelan equine encephalitis virus infections. *Bacteriol Rev* 31: 65-81, 1967.
- 116-SMITH DG, MAMAY HK, MARSHALL RG y WAGNER JC: Venezuelan equine encephalomyelitis. Laboratory aspects of fourteen human cases following vaccination and attempts to isolate the virus from the vaccine. *Am J Hyg* 63: 150-164, 1956.
- 117-SOTO-ESCALONA A, FINOL LT y RYDER S: Estudio de un brote de encefalitis venezolana en el Distrito Páez, Estado Zulia, en octubre de 1968. *Invest Clín* 10(31): 45-57, 1969
- 118-SOTOMAYOR CG: A study of the virus of equine encephalomyelitis in Ecuador. *J Am Vet Med Ass* 109: 478-480, 1946.
- 119-SRIHONGSE S, SCHERER WF y GALINDO P: Detection of arboviruses by sentinel hamsters during the low period of transmission. *Am J Trop Med Hyg* 16: 519-524, 1967.
- 120-SUAREZ OM: Datos entomológicos sobre la epidemia de encefalitis equina en Venezuela. 1962-1964. *Rev Vlana SAS* 31: 873-877, 1966.
- 121-SUAREZ OM y BERGOLD GH: Investigations of an outbreak of Venezuelan equine encephalitis in towns of eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 17: 875-880, 1968.
- 122-SUDIA WD, LORD RD, NEWHOUSE VF, MILLER DL y KISSLING RE: Vector-host studies of an epizootic of Venezuelan equine encephalomyelitis in Guatemala, 1969. *Am J Epidemiol* 93: 137-143, 1971.
- 123-SUDIA WD, NEWHOUSE VF y HENDERSON BE: Experimental infection of horses with three strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. II. Experimental vector studies. *Am J Epidemiol* 93: 206-211, 1971.
- 124-SULBARAN SOLIS G y FERREIRA H: Informe sobre hallazgos en algunas investigaciones de laboratorio en encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 4(6):41-46, 1963.

- 125-SUTTON LS y BROOKE CC: Venezuelan equine encephalomyelitis due to vaccination in man. *JAMA* 155: 1473-1476, 1954.
- 126-TABER LE, HOGGE Jr AL y MCKINNEY RW: Experimental infection of dogs with two strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 14: 647-651, 1965.
- 127-TASKER JB, MIESSE ML y BERGE TO: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. III. Distribution in tissues of experimentally infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 11: 844-850, 1962.
- 128-THEILER M: Action of sodium desoxycholate on arthropodborne viruses. *PSEBM* 96: 380-382, 1962.
- 129-THORPE BD, SMART KL y SIDWELL RW: Arbovirus complement-fixing antibodies in sera of wildlife of West Central Utah. *PSEBM* 118: 179-181, 1964.
- 130-TIGERTT WD y DOWNS WG: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis in Trinidad, W.I. I. The 1943-1944 epizootic. *Am J Trop Med Hyg* 11: 822-834, 1962.
- 131-TIGERTT WD, BERGE TO y DOWNS WG: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis in Trinidad, W.I. II. Serological status of human beings. 1954-1958. *Am J Trop Med Hyg* 11: 835-840, 1962.
- 132-VAN TONGEREN HAE: Arbovirus group A spectrum in the province of Brokopondo, Surinam. A serological survey. *Trop geogr Med* 17: 172-185, 1965.
- 133-VENTURA AK y SCHERER WF: Infectivity of nucleic acid and adsorptive properties of Venezuelan encephalitis virions inactivated by lipid solvents. *PSEBM* 134: 583-590, 1969.
- 134-VICTOR J, SMITH DG y POLLACK AD: The comparative pathology of Venezuelan equine encephalomyelitis. *J Infect Dis* 98: 55-66, 1956.
- 135-WACHTER RF y JOHNSON EW: Lipid content of the equine encephalitis virus. *Federat Proc* 21: 461, 1962.
- 136-WENGER F: Hallazgos de anatomía patológica en la reciente epidemia de encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 4(7): 21-45, 1963.
- 137-WENGER F: Necrosis cerebral masiva del feto en caso de encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 8(21): 13-31, 1967.

- 138- WHITFIELD SG, MURPHY FA y SUDIA WD: Eastern equine encephalomyelitis virus: an electron microscopic study of *Aedes triseriatus* (Say) salivary gland infection. *Virology* 43: 110-122, 1971.
- 139- WONG-CHIA C y SCHERER WF: Aislamiento del virus de la encefalitis venezolana de un murciélago frugívoro (*Artibeus turpis*) en México. *Bol Of San Panam* 70: 339-343, 1971.
- 140- WORK TH: Serological evidence of arbovirus infection in the Seminole indians of southern Florida. *Science* 145: 270-272, 1964.
- 141- YOUNG NA y JOHNSON KM: Antigenic variants of Venezuelan equine encephalitis virus: their geographic distribution and epidemiologic significance. *Am J Epidemiol* 89: 286-307, 1969.
- 142- YOUNG NA y JOHNSON KM: Viruses of the Venezuelan equine encephalomyelitis complex. Infection and cross-challenge of rodents with VEE, Mucambo, and Pixuna viruses. *Am J Trop Med Hyg* 18: 280-289, 1969.
- 143- YOUNG NA, JOHNSON KM y GAULD LW: Viruses of the Venezuelan equine encephalomyelitis complex. Experimental infection of panamanian rodents. *Am J Trop Med Hyg* 18: 290-296, 1969.
- 144- ZARATE ML y SCHERER WF: Contact-spread of Venezuelan equine encephalomyelitis virus among cotton rats via urine or feces and the naso-or oropharynx. A possible transmission cycle in nature. *Am J Trop Med Hyg* 17: 894-899, 1968.
- 145- ZEBOVITZ E y BROWN A: Temperature-sensitive steps in the biosynthesis of Venezuelan equine encephalitis virus. *J Virol* 1: 128-134, 1967.
- 146- ZHDANOV VM y ERSHOVA II: Inhibition of reproduction of Venezuelan equine encephalomyelitis virus with puromycin. *Antibiotiki* 10: 255-259, 1965.
- 147- ZHDANOV VM, YERSHOV FI y URYVAYEV LV: Ribonucleic acids synthesized in Venezuelan equine encephalomyelitis virus-infected cells. *Virology* 38: 355-358, 1969.
-