
Anticuerpos contra Encefalitis equina Venezolana en la Población Humana del Estado Zulia, Venezuela, en 1967.

*Slavia Ryder**, *Luis T. Finol*** y *Armando Soto Escalona**.

*Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo 4001-A, Venezuela

**Servicio Cooperativo de Salud, Maracaibo, Venezuela.

Resumen. Durante 1967 setecientos noventa y tres muestras de suero de personas residentes en 14 localidades del Estado Zulia, Venezuela, fueron estudiadas mediante las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y neutralización en cultivo de células de embrión de pato, para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la Encefalitis equina Venezolana, cinco años después de una severa epidemia que, comenzando por el Estado Zulia, afectó a casi toda la nación. A excepción de las poblaciones de la Guajira (Edo. Zulia), los resultados obtenidos parecen indicar que el virus estuvo activo en gran parte del Estado hace 20-30 años, y que no había causado problemas desde tal época hasta la epidemia de 1962-64. Las localidades de la Guajira estudiadas presentaban una alta tasa de positividad, y no se encontraron anticuerpos en aquellos individuos nacidos después de la epidemia de 1962-64, lo cual afirma el carácter epidémico de la enfermedad en esta zona del país. Se considera la posibilidad de que exista en esta área un foco enzoótico que mantenga el virus en la naturaleza e irrumpa periódicamente para causar los brotes epidemo-epizoóticos. Los trabajos encaminados a dilucidar este problema han sido emprendidos y serán motivo de futuras comunicaciones.

Antibodies to Venezuelan equine encephalitis virus in the human population of Zulia State, Venezuela, in 1967.

Invest Clin 39:37-51, 1971.

During 1967, seven hundred and ninety three samples of blood serum of persons resident in 14 localities of Zulia State, Venezuela, were studied by means of hemagglutination-inhibition and neutralization tests in duck embryo cell cultures in order to determine the presence of antibodies to the

Venezuelan equine encephalitis virus. This study was carried out five years after a severe epidemic which started in this State and affected almost all the nation. With the exception of the populations of the Guajira (Zulia State), the results obtained seem to indicate that the virus was active in a great part of the State, some 20-30 years ago, and had not caused any problems since that time up until the epidemic of 1962-64. The localities of the Guajira which were studied, presented a high rate of positivity, and no antibodies were found in individuals born after the 1962-64 outbreak, which affirms the epidemic character of the disease in this area of the country. We consider the possibility that in this area there exist an enzootic focus which maintains the virus in the environment and acts periodically to cause the epidemioepizootic outbreaks. Studies intended to elucidate this problem are already under way and will be the object of future communications.

INTRODUCCION

La incidencia de infección natural por arbovirus había sido poco estudiada en Venezuela hasta 1962. Se habían reportado aislamientos del virus de la fiebre amarilla en humanos y monos (3), y las escasas encuestas serológicas practicadas en la población humana (9, 15) habían señalado la presencia del virus Mayaro, fiebre amarilla y probablemente Ilheus, en grupos de indios de la Sierra de Perijá, Estado Zulia, y del río Ventuari, Estado Bolívar en las fronteras con Colombia y Brasil, respectivamente; del virus dengue en Maracaibo y Caracas; y de encefalitis equina venezolana (EEV), fiebre amarilla, dengue, Ilheus, Cache Valley y San Luis, en el noroeste de Venezuela.

Desde el aislamiento original del virus de la EEV en equinos en 1938 (2, 17), en Venezuela, no se tenían reportes de la actividad de este agente ni de ningún otro arbovirus, hasta que en 1959, Negrette (18) denuncia por primera vez una epi-

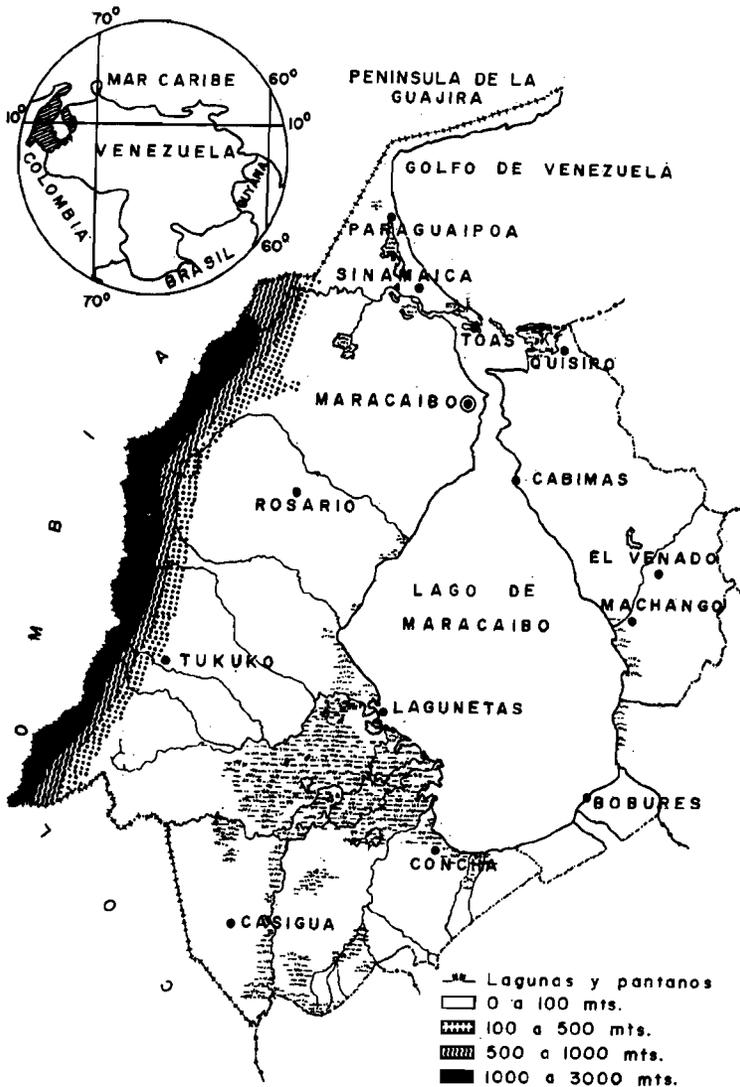
demia de encefalitis en la zona suburbana de Maracaibo, y ese mismo año uno de nosotros (LTF) tiene la oportunidad de observar varios casos sospechosos de la enfermedad en el Distrito Páez del Estado Zulia. Pero no fue hasta fines de 1962 cuando, a raíz de una severa epidemia de encefalitis que se inició en el área de la Guajira venezolana, Estado Zulia, y se extendió a todo el país durante 1963 y principios de 1964, se aísla e identifica al virus de la EEV como causante de tal brote (1, 20). Un estudio epidemiológico retrospectivo (1) hace suponer que las epidemias de encefalitis anteriores a 1962 en esta zona, y registradas en los Anuarios de Epidemiología como influenza, fueron causadas por el virus de la EEV.

Durante 1967 realizamos una encuesta serológica en la población humana residente en el Estado Zulia, con el objeto de determinar el grado de inmunidad de la población al virus de la EEV, y su distribución geográfica. Las áreas de estudio comprendieron no sólo aquellas

donde se había demostrado actividad viral reciente, sino que se incluyeron muestras procedentes de zonas aparentemente sin actividad previa del agente.

Descripción de las Areas de Estudio.

El Estado Zulia (Fig. 1) se encuentra situado al Noroeste de Venezuela, y limita con la República de Colombia por el oeste, de la que está separada en un gran trayecto por la Sierra de Perijá. Las masas monta-



ñosas de la Sierra llegan a tener hasta 3000 mts. sobre el nivel del mar y sus alturas descienden notablemente hacia el norte y se pierden en las tierras llanas de la Península de la Guajira. El resto del Estado forma parte de la cuenca sedimentaria Zulia-Falcón, que se caracteriza por tierras sumamente bajas, bordeadas en su interior por las grandes masas de agua del Golfo de Venezuela y del Lago de Maracaibo. Los ríos que corren por esta cuenca desembocan en el lago; hacia el norte algunos ríos se secan en la estación de verano; en la parte sur los principales ríos mantienen agua todo el año y se salen de sus cuencas en la estación de lluvia, cubriendo gran extensión de la región por varios meses del año, dando lugar a grandes extensiones pantanosas en la parte sur del Estado. El clima dominante es el tropical.

Siguiendo la clasificación de Ewel y Madriz (10) ubicaremos las distintas poblaciones estudiadas según el tipo de asociación climática predominante. Paraguaipoa, Sinamaica e Isla de Toas, se encuentran en la zona de bosque muy seco tropical, que se caracteriza por terrenos llanos con una temperatura media entre 23°C y los 29°C. El promedio anual de precipitación varía de 500 a 1000 mm, lo cual es dos a cuatro veces menor que la evapotranspiración potencial y coloca a la zona como semiárida. La vegetación es escasa y está constituida por cujíes, cactáceas y tunas. El pastoreo de chivos ha contribuido en gran parte a la erosión de estos suelos.

Numerosas lagunas y ciénagas de agua salobre y fresca se encuentran en la zona. Las de agua salobre se encuentran sembradas por manglares y enea y reducen su volumen, y hasta llegan a desaparecer, en la época de verano. Las de agua fresca mantienen agua casi todo el año. Cerca de la desembocadura del río Limón, el más importante del área, se encuentra la laguna de Sinamaica, rodeada de manglares y cocotales, con sus curiosas casas montadas sobre horcones.

Villa del Rosario, Concha, Bubures, Machango y El Venado están situadas en áreas de bosque seco tropical, con precipitaciones entre los 1000 y 2000 mm y temperatura media entre 22°C y 29°C. A pesar de que la evapotranspiración potencial es mayor que la lluvia, las zonas están ubicadas en la provincia subhúmeda. Se caracteriza por una fuerte sequía de 4 a 5 meses de duración, seguida por una estación con sobrante de agua. La vegetación típica es la de sabana, haciéndose cada vez más húmeda al sureste del lago. Bordeando los caudalosos ríos que se desbordan regularmente, se encuentran bosques con una flora muy rica. Ganadería y explotación agrícola son los renglones más importantes dentro de estas zonas de vida.

Lagunetas es una aldea de palafitos situada en la desembocadura del río Santa Ana. Aunque ubicada en esta zona, su condición de "ranchería" de tablas construida sobre estacas, rodeada de pantanos, le dan una característica especial, di-

ferente a las otras poblaciones descritas. El aspecto general es semejante al de la ya descrita laguna de Sinamaica, aunque el agua es fresca a este nivel del lago.

Casigua fue un centro importante de explotación petrolera; hoy día esta actividad está muy reducida. Esta población se encuentra en la zona de bosque húmedo tropical, con un promedio de precipitación entre 1900 a 3700 mm anuales. La temperatura varía entre 22°C y 26°C, media de 24°C. La vegetación es exuberante.

A la misma zona de bosque húmedo pertenece la reservación de indios del Tukuko; sin embargo, su situación al pie de la Sierra de Perijó la hace gozar de una temperatura media anual de 18°C. Precipitación entre 1100 y 2000 mm anuales.

Se incluyeron en la muestra a Maracaibo, capital del Estado Zulia, y Cabimas, la segunda ciudad en importancia del Estado, y centro de la actividad petrolera de la zona. Están situadas a escasos metros sobre el nivel del mar en la denominada formación de bosque seco tropical.

MATERIAL Y METODO

Entre abril y diciembre de 1967 fueron recolectadas 793 muestras de sangre de humanos, residentes en las 14 poblaciones descritas, con un promedio de 57 muestras por localidad. Las de los menores de 7 años y mayores de 16 fueron tomadas, en su mayoría, en las consultas de las Medicinas Rurales. Las de los niños entre 8 y 16 años en las escuelas locales. En

Lagunetas y Bobures fueron tomadas a domicilio.

Se recomendó a las personas responsables de la recolección de las muestras, anotar entre los datos pertinentes, el tiempo de estadía en la población y en otras zonas donde hubiese vivido. Sin embargo, este dato fue recogido en contadas ocasiones, por lo que en la discusión de los resultados se toma en cuenta esta falta de información.

Las muestras fueron obtenidas de la vena del pliegue del codo en tubos al vacío, y colocadas en refrigeración. Después de separado el coágulo, los sueros fueron congelados a -20°C hasta el momento de realizar las pruebas.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) se llevó a cabo según la técnica de Clarke y Casals (7) modificada por Sever (21), utilizando el caolín para eliminar los inhibidores no específicos. La prueba se efectuó en platos plásticos desechables (Tipo U, Cooke Engineering, Alexandria, Va., USA). El antígeno usado fue el de la EEV (Biological Reagents Section, CDC, Atlanta, Ga., USA), utilizando 8 unidades hemaglutinantes. El pH óptimo fue de 6,0 a 37°C. Se consideró positiva toda muestra que tuviera un título inhibitorio de 1/10 ó más.

La prueba de neutralización se hizo en los laboratorios de Arbovirus del CDC utilizando la técnica de inhibición de placas bajo capa de agar. El virus utilizado fue el de la EEV cepa vacuna. Las diluciones del virus se mezclaron a partes iguales con el suero problema no diluido y

sin inactivar; se incubaron a 37°C por una hora, y se inoculó 0,1 ml de la mezcla a cultivo de células de embrión de pato. La adsorción se llevó a cabo a 37°C por una hora, y se cubrieron luego con agar Noble más medio nutritivo compuesto de extracto de levadura, hidrolizado de lactalbúmina, 4% de suero de ternera fetal y 6% de bicarbonato de sodio (7,5%). Se utilizó suero humano fresco no diluido y previamente titulado, para las diluciones del virus, con el fin de prevenir la pérdida del factor lábil accesorio. Se consideró positiva toda muestra que neutralizara 1,7 ó más logaritmos del virus.

RESULTADOS

De las 14 localidades estudiadas (Tabla 1), las cifras del Tokuko (0%), Maracaibo (1%), y Quisiro (1%), nos hacen pensar en la ausencia de actividad del virus en estas localidades, o bien, como es el caso de Maracaibo, la muestra es demasiado pequeña para permitir que la situación real quede reflejada. Llama la atención que, a pesar de estar ubicado Quisiro en el área recorrida por la onda epidémica de 1962, acusara tan baja positividad. Sin embargo, nuestros datos corroboran lo señalado por Avilán (1) de que no se presentaron casos humanos de EEV en aquella población durante la citada epidemia. Una posible explicación sería que la presencia de fuertes corrientes de aire que recorren la zona dificultan la permanencia de los vectores en cantidad suficiente

para infectar a los individuos susceptibles.

Por las razones antes expuestas, en los análisis que siguen hemos excluido las 166 muestras provenientes de estas tres localidades.

De las 627 muestras de suero restantes, 124 poseían anticuerpos IH contra EEV en títulos de 1/10 ó más. Practicada la prueba de neutralización se obtuvieron 103 positivos. Basados en trabajos anteriores (12, 19) en los que se demostró que en los sueros negativos para EEV mediante la prueba IH eran invariablemente negativos en neutralización, ninguno de los IH negativos se estudió mediante esta última prueba. Los porcentajes se basan, por tanto, en los positivos en la prueba de neutralización. Observamos en la Tabla 1 que el 16% de la muestra estudiada presentaba anticuerpos antiEEV.

Es claramente visible que, basados en los resultados serológicos, podemos agrupar a las poblaciones en dos grupos: A y B. El grupo A, formado por Sinamaica, Paraguai-poa e Isla de Toas, en las cuales ha habido historia conocida de brotes epidémicos de la enfermedad y que presentan altos porcentajes de positividad; y el grupo B, formado por las otras 8 poblaciones, aparentemente sin epidemias hasta el momento del estudio, con un promedio de positividad alrededor del 10%.

Tamaño de la muestra.

La Tabla 2 resume la relación porcentual de las muestras con la población estimada en cada una de las 11 localidades para el 1o de julio

TABLA 1
ENCUESTA SEROLOGICA PARA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
PORCENTAJE DE POSITIVOS EN LA POBLACIONES ESTUDIADAS.
ESTADO ZULIA. 1967.

Localidad	Nº Muestras	Nº Positivos		* %
		IH	NEUT.	
Sinamaica	66	29	29	44
Paraguaipoa	54	17	17	31
Isla de Toas**	60	12	12	20
Machango	60	9	8	13
Villa del Rosario	48	8	6	13
Bobures	60	10	7	12
Cabimas	57	6	6	11
Concha	49	14	5	10
El Venado	60	8	5	8
Lagunetas	55	5	4	7
Casigua	58	6	4	7
Sub-Total	627	124	103	16
Quisiro***	44	1	1	2
Maracaibo***	67	1	1	1
Tukuco***	55	1	0	0
Total	793	127	105	13

IHO Inhibición de la hemaglutinación

NEUT.= Prueba de neutralización

* Porcentaje basados en los positivos en la prueba de neutralización.

** El Toro, capital de la Isla.

*** Eliminado de la casuística.

de 1967. Puede observarse claramente que el tamaño de la muestra es pequeño, aunque a nuestro juicio, no invalida la orientación general que se desprende de los resultados obtenidos.

Tasas de positividad.

En la Tabla 3 se ha estimado la representación que, teóricamente, deben tener los positivos en cada una de las localidades. Esta estimación nos permite obtener las tasas de positividad por 1000 habitantes.

En las localidades del grupo A, las tasas varían entre 440 por 1000 habitantes en Sinamaica, y 199 por

1000 en Isla de Toas. En el grupo B, la tasa más elevada apenas alcanza a 133 por 1000; muy por debajo de la menor del grupo A.

Tasas por edades.

En las poblaciones del grupo A (Fig. 2) observamos, que no hubo positivos por debajo de los 5 años. Entre 5 y 9 años, sólo se apreció actividad, reflejada en la presencia de anticuerpos, en la población de Sinamaica. A partir de los 10 años hay una elevación progresiva de la tasa de positividad por 1000 habitantes.

TABLA 2
ENCUESTA SEROLOGICA PARA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
TAMAÑO DE LA MUESTRA EN RELACION A LA POBLACION
RESPECTIVA. ESTADO ZULIA, 1967.

Localidad	Muestras	Población*	%
Grupo A			
Sinamatca	66	1.847	3,6
Paraguaypoa	54	1.972	2,7
Isla de Toas	60	938	6,4
Grupo B			
Machango	60	1.046	5,7
Villa del Rosario	48	14.820	0,3
Bobures	60	2.551	2,4
Cabimas	57	120.267	0,05
Concha	49	595	8,2
El Venado	60	1.435	4,2
Lagunetas	55	672	8,2
Casigua	58	6.918	0,8

* Para el 1o de julio de 1967.

TABLA 3
ENCUESTA SEROLOGICA PARA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA
POSITIVOS ESTIMADOS Y TASAS POR 1000 HABITANTES
ESTADO ZULIA 1967

Localidad	Pob.	Muestra	Posit.	Posit. est.	Tasa
Grupo A					
Sinamatca	1.847	66	29	(812)	440
Paraguaypoa	1.972	54	17	(62)	315
Isla de Toas	938	60	12	(188)	199
Grupo B					
Machango	1.046	60	8	(139)	133
Villa del Rosario	14.820	48	6	(1.853)	125
Bobures	2.551	60	7	(298)	117
Cabimas	120.267	57	6	(12.660)	105
Concha	595	49	5	(61)	103
El Venado	1.435	60	5	(120)	84
Lagunetas	672	55	4	(49)	73
Casigua	6.918	58	4	(477)	69

En el grupo B, como puede apreciarse en la Fig. 3, las barras tienen alturas por debajo de las observadas en el grupo A. Es posible observar la

regularidad de los resultados de Concha y Villa del Rosario, en contraposición al resto de las poblaciones.

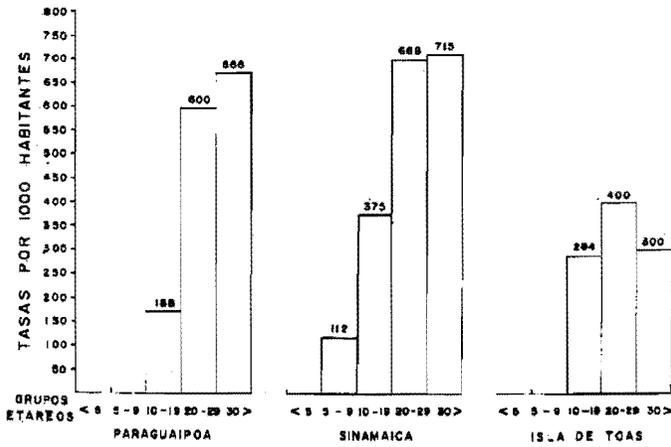


Fig. 2.

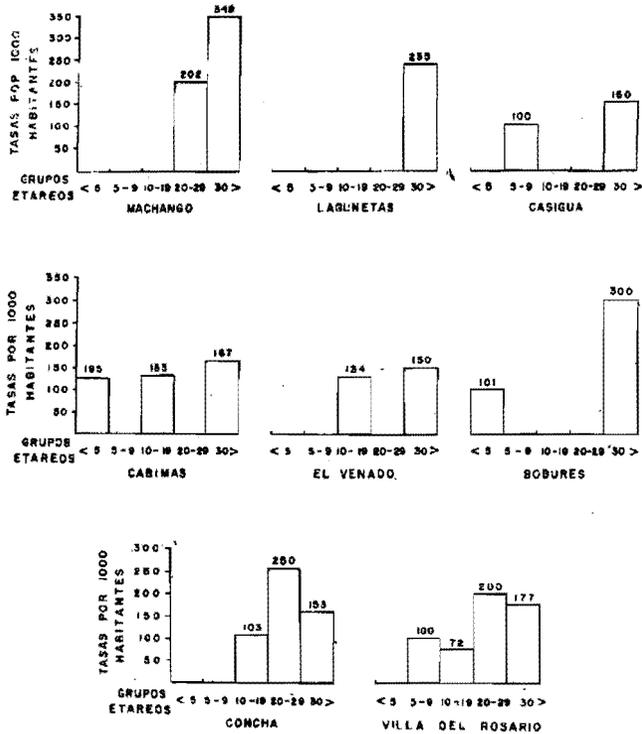


Fig. 3.

Podría asegurarse, de manera general, que en las seis poblaciones restantes, los mayores de 30 años (mayores de 20 en Machango) han estado en contacto con el virus en algún momento de su vida. Los positivos en edades más jóvenes se presentan en forma irregular y serán motivo de discusión más adelante.

Distribución por sexo.-

La distribución de los positivos por sexo (Tabla 4) no acusó preferencia entre varones y hembras. Hubo, sin embargo, una marcada diferencia con predominio del sexo masculino en Villa del Rosario, Concha y Casigua, y lo contrario sucedió en Sinamaica; todo lo cual atribuimos a defectos de la muestra.

DISCUSION

Desde la epidemia de 1962-1964 hasta el momento de la encuesta (1967), no habían sido reportados casos de EEV en las localidades de la Guajira aquí estudiados. En la Fig. 2 observamos que, como esperábamos, no se detectaron anticuerpos en niños nacidos después de 1962 en estas poblaciones.

Las tasas de positividad en las poblaciones del grupo A (Tabla 3) van desde 199 por 1000 habitantes hasta 440 por 1000, cifras bastante elevadas si se comparan con las del grupo B, sin historia conocida de brotes importantes de la enfermedad, y en las cuales las tasas son francamente inferiores.

Las fallas en las muestras para el presente trabajo, especialmente en su

TABLA 4

ENCUESTA SEROLOGICA PARA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA. DISTRIBUCION DE LOS POSITIVOS POR SEXO EN LAS LOCALIDADES ESTUDIADAS. ESTADO ZULIA. 1967.

Localidad	Varones			Hembras			Total		
	Nº	Posit.	%	Nº	Posit.	%	Nº	Posit.	%
Grupo A									
Sinamaica	27	9	33	39	20	51	66	29	44
Paragualpoa	25	9	36	29	8	28	54	17	31
Isla de toas	19	4	21	41	8	20	60	12	20
Grupo B									
Machango	27	4	15	33	4	12	60	8	13
Villa del Rosario	17	4	24	31	2	6	48	6	13
Bobures	30	3	10	30	4	13	60	7	12
Cabimas	32	3	9	25	3	12	57	6	11
Concha	21	3	14	28	2	7	49	5	10
El Veneado	18	1	6	42	4	10	60	5	8
Lagunetas	24	2	8	31	2	6	55	4	7
Casigua	30	3	10	28	1	4	58	4	7
Total	270	45	17	357	58	16	627	103	16

volumen (Tabla 2), distribución insuficiente por edades y recolección de datos básicos como el tiempo de permanencia en cada una de las localidades, no nos permite especular muy extensamente sobre los resultados obtenidos. Sin embargo, nos atrevemos a sugerir que, descartando a Concha y Villa del Rosario, el virus había estado activo en esas áreas hace 20 a 30 años, o, por el contrario, los anticuerpos fueron adquiridos por contacto con el virus en zonas diferentes a su actual residencia.

Los positivos en edades más jóvenes, de Cabimas, El Venado, Bobures y Casigua, parecen representar casos infectados en la epidemia de 1962-1964; y en apoyo a esta teoría estarían los resultados de Avilán (1) quien reportó casos humanos de infección por EEV durante la epidemia de 1962-1964 en las poblaciones de Villa del Rosario y Cabimas, y los de Briceño-Rossi (4) quien aisló el virus de casos humanos infectados en junio de 1963 en Villa del Rosario, y en octubre de ese mismo año en Cabimas.

Sin embargo, en una población uniformemente expuesta a la infección, resulta extraño que fueran afectados algunos grupos de edades y otros no. Por ejemplo, el grupo de 5-9 años de Casigua; y escaparon los menores de 5 años y los de 10-29 años. Parecería más lógico suponer que estos individuos hayan adquirido sus anticuerpos en zonas epidémicas, extendernos en consideraciones, debido al escaso número de muestras de que dispusimos.

La regularidad en los resultados en las poblaciones de Concha y Villa del Rosario (Fig. 3), muy semejante a los del grupo A, parece denotar la presencia del virus en el curso de las últimas décadas, ya sea en forma de epidemias, lo cual se apoyaría en los resultados anteriormente citados (1, 6), o ser reflejo del contacto directo con un foco enzoótico que ha ido creando anticuerpos en la población. Esto es particularmente factible en Concha ya que la zona es muy similar, ecológicamente, a los focos enzoóticos de Panamá y Centro América (K.M. Johnson, comunicación personal).

Aun cuando la epidemiología de la enfermedad, de acuerdo con los conocimientos actuales, haría pensar en una mayor exposición al riesgo por parte de los hombres a la picadura de los vectores, en el presente reporte la diferencia de positividad entre uno y otro sexo (Tabla 4) no nos permite pensar que la enfermedad acuse preferencia por alguno de los dos. Será necesaria sin duda, una mayor experiencia en trabajo de campo para establecer alguna hipótesis valedera.

Como hemos podido observar, la enfermedad es francamente epidémica en la zona de la Guajira, y parece necesaria la presencia de una serie de factores para que se desarrolle un nuevo brote: aumento de la proporción de susceptibles, alta densidad de mosquitos provocada por un período más largo de lluvias, y otros aún no bien definidos. En este sentido pudimos comprobar que un año después de esta encuesta, en 1968, un nuevo brote de EEV afectó a las poblaciones de

la Guajira, y la distribución de los casos señaló que sólo un 42 por 1000 de los mayores de 6 años contrajeron la enfermedad, mientras que un 110 por 1000 de la población menor de 6 años, los susceptibles para aquella época, fue afectada (22). Asimismo pudo observarse que Sinamaica tuvo una tasa de ataque mucho menor que Paragaitpoa; lo que concuerda con la diferencia inmunitaria que hallamos en nuestro estudio entre ambas poblaciones (Tabla 1 y Figura 2).

Durante una epidemia el hombre parece jugar un papel importante en la transmisión de la enfermedad por el hecho de tener títulos de viremia suficientemente elevados como para infectar a los mosquitos (5), o a través del contacto directo ya que el virus ha sido hallado en la garganta de las personas afectadas (11), y se conoce que es posible la infección con este virus por vía aérea entre caballos (16). Pero, en los periodos interepidémicos, el virus debe mantenerse en un foco enzoótico cercano y desde allí introducirse en la población periódicamente; (8, 13, 14). Las condiciones áridas de la Guajira no parecen ser las mas propicias para el asentamiento de estos focos; sin embargo, en estudios posteriores hemos encontrado en las lagunas de agua fresca de los alrededores de Sinamaica, una alta densidad de mosquitos y roedores salvajes, los cuales podrían ser los responsables del mantenimiento del ciclo extrahumano del virus (datos por publicar). En este sentido, se hace necesario investigar mas pro-

fundamente el papel que ellos juegan en la epidemiología de la enfermedad en esta región del país.

AGRADECIMIENTO

A los Médicos Jefes y personal técnico de las Medicaturas Rurales, por la ayuda en la recolección de las muestras; al Dr. Philip H. Coleman y técnicos del laboratorio de Arbovirus del Centro para el Control de Enfermedades en Atlanta, Norteamérica, y al Sr. Germán Serrano, por la valiosa colaboración en las pruebas serológicas; y al Dr. Karl M. Johnson, por la discusión crítica del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AVILAN J., El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. Rev Viana SAS 29:231-321, 1964.
- 2- BECK C.E., WYCKOFF R.W.G.: Venezuelan equine encephalomyelitis. Science 88:530, 1938.
- 3- BERGOLD G.H., WEIBEL J.: Demonstration of yellow fever virus with the electron microscope. Virology 17:554-562, 1962.
- 4- BRICEÑO-ROSSI A.L.: Estudios del virus encefalomielítico equino venezolano. Aislamiento y frecuencia del virus en la sangre y encefalo de casos humanos estudiados durante la epidemia noviembre-diciembre 1962 y enero-octubre 1963. Rev Viana SAS 29:354-392, 1964.
- 5- BRICEÑO-ROSSI A.L.: Estudio del virus encefalomielítico venezolano.

- Viremia. *Rev Viana S.A.S.* 29:425-429, 1964.
- 6- BRICEÑO-ROSSI A.L., SEQUERA C.L., SEGURA-DIAZ H.: Estudio inmunológico de la encefalitis equina venezolana y de su distribución geográfica en Venezuela. *Rev Viana SAS* 29:438-456, 1964.
 - 7- CLARKE D.H., CASALS J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7:561-573, 1958.
 - 8- CHAMBERLAIN R.W., SUDIA W.D., WORK T.H., COLEMAN P.H., NEWHOUSE V.F., JOHNSTON Jr. J.G.: Arbovirus studies in South Florida, with emphasis on Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Epidemiol* 89:197-210, 1969.
 - 9- DOWNS W.G., SPENCE L., NUÑEZ-MONTIEL O.: Un estudio serológico sobre la frecuencia de virus de encefalitis transmitidos por artrópodos (arbovirus) en Venezuela. Estudio preliminar. *Rev Viana S.A.S.* 26:145-147, 1961.
 - 10- EWEL J.J., MADRIZ A.: Zona de vida de Venezuela. Publicación del Ministerio de Agricultura y Cría. Venezuela. Caracas. 1968.
 - 11- FOSSAERT H.: Investigación de casos humanos de encefalitis equina venezolana. Diagnóstico de laboratorio. *Rev Viana. S.A.S.* 31(sup. 3):843-852, 1966.
 - 12- GROOT H., KERR J.A., SANMARTIN C., VIDALES H.: Antibodies to yellow fever and other arthropod-borne viruses in human residents of San Vicente de Chucuri, Santander, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 8:175-189, 1959.
 - 13- GRAYSON M.A., GALLINDO P.: Epidemiologic studies of Venezuelan equine encephalitis virus in Almirante, Panamá. *Am J Epidemiol* 88:80-96, 1968.
 - 14- JONKERS A.H., SPENCE L., DOWNS W.G., AITKEN T.H.G., WORTH C.B.: 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.
 - 15- JONKERS A.H., DOWNS W.G., SPENCE L., AITKEN T.H.G.: Arthropod-borne encephalitis viruses in northeastern South America. II. A serological survey of northeastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 14:304-308, 1965.
 - 16- KISSLING R.E., CHAMBERLAIN R.W., NELSON D.B., STAMM D.D.: Venezuelan equine encephalomyelitis in horses. *Am J Hyg* 63: 274-287, 1956.
 - 17- KUBES V., RIOS F.A.: The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 90:20-21, 1939.
 - 18- NEGRETTE A.: Encefalitis epidémica. *Invest Clín* 1:13-34, 1960.
 - 19- SANMARTIN C., DUEÑAS A.: Hemagglutination-inhibition and neutralization test for the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 8:346-348, 1959.
 - 20- SELLERS R.F., BERGOLD G.H., SUAREZ O., MORALES A.: Investigations during Venezuelan equine en-

-
- cephalitis outbreaks in Venezuela. 1962-1964. *Am J Trop Med Hyg* 14:460-469, 1965.
- 21- SEVER J.L.: Application of a micro-technique to viral serological investigations. *J Immunol* 88:320-329, 1962.
- 22- SOTO A.J., FINOL L.T., RYDER S.: Estudio de un brote de encefalitis venezolana en el Distrito Páez, Edo. Zulia, en octubre de 1968. *Invest Clin* 31:45-57, 1969.