

## **Transmisión de cepas suramericanas del virus de la Encefalitis equina Venezolana por mosquitos *Aedes aegypti*.**

*Slavia Ryder\* y William F. Scherer\*\*.*

\*Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo 4001-A, Venezuela y \*\*Departamento de Microbiología, Cornell University Medical College, New York, N.Y., U.S.A.

**Resumen.** Se hicieron ensayos de transmisión con cepas venezolanas, peruanas y colombianas del virus de la Encefalitis equina Venezolana (EEV), y mosquitos *Aedes aegypti*. No se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de transmisión, excepto con una cepa peruana (71D1252), catalogada como un nuevo subtipo antigénico, cuyo porcentaje de transmisión fue muy bajo. Se concluye que *A. aegypti* transmite eficazmente las cepas estudiadas, aunque no tiene capacidad de selección entre las mismas.

### **Transmission experiments with south american strains of Venezuelan equine encephalitis virus and *Aedes aegypti* mosquitoes.**

*Invest Clin 18(3):158-170, 1977.*

**Abstract.** Transmission experiments were performed using venezuelan, peruvian and colombian strains of VEE virus and *Aedes aegypti* mosquitoes. No statistical differences in percentage of transmission was found, except with one peruvian strain (71D1252), probably a new antigenic subtype. We conclude that *A. aegypti* transmitted south american strains of VEE virus but does not have the capacity of selection between strains.

### **INTRODUCCION**

En 1969, Young y Johnson (14) agruparon los diferentes tipos inmunológicos del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), utilizando una modificación de la técnica

de la inhibición a la hemaglutinación. Se logró de esta manera, diferenciar no sólo las cepas enzoóticas de las epizoóticas, sino también separarlas según su lugar de origen. Sin embargo, la prueba requiere antisueros preparados en la rata espi-

nosa (*Proechimys semiespinosus*), la cual no se encuentra disponible para la mayoría de los laboratorios que trabajan en este campo.

Las variantes enzoóticas pueden ser diferenciadas en el laboratorio por otras pruebas. Las cepas enzoóticas producen placas grandes en cultivos de células de riñón de mono verde africano (Vero) mientras que las producidas por las epizoóticas son de menor tamaño. El rango de pH de la prueba de hemaglutinación está alrededor de 6,2- 6,4 para las enzoóticas, y 6,0-6,2 para las epizoóticas (1). Sin embargo, estas pruebas adolecen de fallas, ya que se ha podido demostrar que ciertas cepas enzoóticas aglutinan a pH bajo, y que los subtipos enzoóticos III y IV y la TC83, la variante atenuada usada como vacuna, producen placas pequeñas en células Vero (3).

El mejor método hasta ahora conocido para distinguir entre cepas enzoóticas y epizoóticas de la EEV, es inocular caballos, ya que se ha reportado (2, 13) que las cepas enzoóticas producen niveles bajos de viremia, enfermedad leve o no manifiesta y raramente mata caballos, mientras que las epizoóticas producen altas viremias y síntomas clínicos, y en ocasiones la muerte. Sin embargo, esta prueba resulta costosa y se necesitarían facilidades de laboratorio muy complejas.

Es conocido que ciertos mosquitos están involucrados únicamente en los ciclos epizoóticos de la EEV y no en los enzoóticos (7, 12); por lo tanto, se pensó que la competencia de un mosquito en transmitir una

cepa determinada podría servir como indicador entre cepas enzoóticas y epizoóticas. Experimentos previos comparando *Aedes taeniorhynchus* y *Aedes aegypti*, probados vectores epidémicos (9, 11), demostraron que transmitían más eficazmente las cepas epizoóticas de Centroamérica y México, que las enzoóticas (4).

Nuestro propósito fue el de extender estos estudios utilizando cepas suramericanas de la EEV; algunas de ellas aisladas durante epidemias de la enfermedad, y otras en regiones donde no ha habido actividad manifiesta de este agente.

## MATERIAL Y METODOS

**Virus.**- Tres aislamientos hechos en el Laboratorio de Virología del Instituto de Investigación Clínica, a partir de humanos, durante las epidemias de EEV ocurridas en el Estado Zulia en los años 1968, 1969 y 1973 (6, 10), fueron utilizadas durante el experimento. La historia de estos aislamientos, así como algunas de sus propiedades, pueden observarse en la Tabla I. El pH fue 6,2 y los tres produjeron placas pequeñas en células Vero.

Otros tres aislamientos del virus de la EEV, provenientes del Perú, fueron estudiados a continuación. Dos de ellos, cepas 71D1249 y 71D1252 fueron aisladas de mosquitos en Iquitos, Perú, en ausencia de reconocida enfermedad en humanos. La cepa 52/73 fue aislada del suero de un burro durante una epidemia de la enfermedad en la

**TABLA I**  
**ORIGEN Y ALGUNAS PROPIEDADES DE TRES CEPAS EPIZOOTICAS VENEZOLANAS**  
**DEL VIRUS DE LA EEV**

Cepas	Origen	Pasajes en el laboratorio <sup>a</sup>	Títulos hemaglutinantes apH <sup>b</sup>					Promedio y tamaño de 20 placas en cultivos de células VERO (mm) Controles <sup>c</sup>			
			5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	Cepa	68U201	69Z1	
E1/68	JMAG, 7 años, varón, suero, 27 Oct 68, Guajira	RLpl 27-28 Oct 68 FEPpl 8 Oct 74	0	0	160	0	0	0	1.0	2.3	1.0
E123/69	XP, 2 años, hembra, suero, 20 Oct 69, Mara	RLpl 20-21 Oct 69 FEPpl 7 Nov 74	0	0	320	40	0	0	0.9	2.2	1.0
E541/73	EG, 8 años, varón, suero, 26 Oct 73, Guajira	RLpl 30-31 Oct 73 FEPpl 3 Dic 74	20	20	80	0	0	0	1.0	2.1	1.0

<sup>a</sup> RL = ratón lactante. FEP = fibroblastos de embrión de pollo.

<sup>b</sup> SA = cerebros de ratones lactantes infectados, extraídos con sacarosa-acetona. FEP = fluido de cultivos de fibroblastos de embrión de pollo. Títulos = recíprocos de las diluciones de hemaglutinación. 0 = < 20.

<sup>c</sup> Probados simultáneamente con una cepa enzootica conocida subtipo I (Guatemala 68U201), y una cepa epizootica (Guatemala 69Z1).

costa norte del Pacífico en 1973. 71D1249 ha sido caracterizada en Panamá como subtipo ID, y 71D1252 es, posiblemente, un nuevo subtipo ya que reacciona con los subtipos I y III (8). Tanto la suspensión original de mosquitos de la cepa 71D1252 como el primer pasaje en ratones lactantes fueron sensibles a la temperatura de incubación: se obtuvieron títulos más altos entre 34 o - 37°C (resultados no publicados).

Se incluyó, además, la cepa 59145, aislada del cerebro de un hámster centinela expuesto en la región del Tibú, Santander, Colombia. Esta cepa probablemente representa una cepa enzoótica ya que proviene de una zona boscosa y húmeda.

**Vectores.**- Mosquitos *Aedes aegypti* fueron utilizados en todos los experimentos. Lamentablemente, dificultades en el mantenimiento de la colonia de *Aedes taeniorhynchus* hicieron imposible un estudio comparativo.

Pupas de *A. aegypti* provenientes de una colonia establecida en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cornell, fueron trasladadas a una jaula de malla metálica y colocadas en un incubador a 28°C y 60-70% de humedad relativa. Se permitió la emergencia de los adultos los cuales fueron alimentados con solución saturada de glucosa. Aproximadamente cada 7 días se permitió que las hembras se alimentaran sobre un ratón normal, colocando luego una toalla de papel en

un envase con agua destilada, para el depósito de los huevos. La toalla era retirada antes de cada comida, secada a temperatura ambiente, y guardada a 18°C.

Para los experimentos, una de las toallas con huevos se colocaba en un envase con agua destilada y se permitía la emergencia de las larvas bajo vacío por 1-2 horas. Luego éstas eran colocadas en una vasija redonda esmaltada y alimentadas diariamente con una mezcla de levadura y alimento de ratas finamente pulverizado. Cinco ó seis días después aparecían las pupas que eran trasladadas en un envase con agua destilada a una jaula de malla metálica. Dos ó tres días después emergían los adultos, los cuales eran mantenidos sin glucosa hasta el momento del experimento (generalmente 24-28 horas).

**Curvas de viremia.**- Para determinar el momento apropiado para que los mosquitos se alimentaran de sangre virémica, se utilizaron hámsters adultos de 8 semanas de edad. Los animales fueron inoculados por vía subcutánea con 0,2 ml de una suspensión del virus que contenía 1000 unidades formadoras de placas (ufp), y sangrados por punción cardíaca usando 0,1 ml de heparina 200 U/ml, a las 24, 30 y 48 horas después de la infección. Las muestras fueron guardadas a -70°C hasta el momento de las titulaciones que fueron hechas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo con medio solidificado con agar.

Los títulos pueden verse en la Tabla II. Con excepción de

**TABLA II**  
**TÍTULOS DE VIREMIA EN HAMSTERS DESPUES DE LA INOCULACION**  
**SUBCUTANEA DE DIFERENTES CEPAS DEL VIRUS DE LA EEV**

Cepas y No. de Pasajes	Títulos de viremia en hamsters <sup>a</sup> por horas después de la inoculación			Tiempo de sobrevida en días
	24	30	48	
EL/68	6.3	7.3	7.5	3
RLp1, FEPpl	6.2	7.4	7.1	3
EI23/69	5.8	6.6	6.6 <sup>b</sup>	-
RLpl, FEPpl	6.7	7.4 <sup>b</sup>	-	-
	5.8	6.5	6.4	3
E541/73	5.9	6.9 <sup>b</sup>	-	-
RLPl, FEPpl	6.6	6.9	7.1	3-5
	5.0	6.2	6.3	3-5
71D1249	8.1	7.5 <sup>b</sup>	-	-
RLpl, FEPp2	6.9	7.0	6.0 <sup>b</sup>	-
	7.8	7.7	7.0	3
71D1252	5.7	6.7	7.7	6
RLPl, FEPpl	4.8	5.8	6.2	17-20
	6.1	7.0	5.8	8
52/73	6.7	7.3	6.7	3-5
RLp3, FERPp2	7.0	7.9	8.0	3-5
	7.1	7.9	6.9	3-5
59145	6.5	7.0	6.6	3
RLp2, FEPp1	6.6	7.6	7.1	3
	7.8	7.8	7.2 <sup>b</sup>	-

a Títulos=  $\log_{10}$  FEP ufp/0.2 mo de sangre de cada hámster.

b Murió después de ser sangrado

71D1252, puede apreciarse que la viremia alcanzó los niveles más altos a las 30 horas, manteniéndose estable hasta las 48 horas o disminuyendo marcadamente. Los animales murieron entre 3 a 5 días, 71D1252 se comportó de manera diferente.

alcanzando el nivel más alto de viremia a las 48 horas (no se tomaron muestras mas tardías) y los animales murieron entre 6 y 20 días. Se escogió 30 horas como el tiempo ideal para el experimento de transmisión con todos los virus, a excep-

ción de 71D1252 que fue hecho a las 48 horas.

#### Experimentos de transmisión.-

A. *aegypti* de 1 a 2 días se les permitió alimentarse sobre un hámster inoculado 30 horas antes (48 para 71D1252) con el virus respectivo. Aproximadamente 80 hembras ingurgitadas de sangre fueron trasladadas con un aspirador de boca a envases plásticos con boca ancha cubiertos con una malla de nylon (generalmente 20 en cada uno). Dentro se colocó un envase con agua y toalla de papel para el depósito de los huevos, y sobre la malla se colocó un algodón impregnado de solución saturada de glucosa. Los envases fueron colocados en un incubador a 28°C y 60-70% de humedad relativa, y el algodón era humedecido diariamente con la solución saturada de glucosa.

Para determinar la cantidad del virus ingerido el día 0, algunas hembras ingurgitadas de sangre fueron colocadas en un envase plástico, anestesiadas con dióxido de carbono, colocadas individualmente en botellas de vidrio que contenían 1 ml de 1% albúmina bovina en Hanks, 300 unidades de penicilina y 300 ug de estreptomycin, y congeladas a -70°C.

El día anterior al experimento de transmisión, las hembras en los envases grandes fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub> y colocadas individualmente en envases de cartón con malla de nylon en la boca. El día del experimento, ratones de 3-4 semanas de edad, afeitados en el abdomen, fue-

ron anestesiados con Nembutal 5-6 mg/ml por vía intraperitoneal usando 0,1 ml por 10 g de peso. Los ratones fueron colocados individualmente sobre la malla por una hora y luego devueltos a su jaula respectiva, numerándolos igual que su mosquito correspondiente. Las hembras, hubiesen tomado sangre o no, fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub> y colocadas individualmente en botellas de vidrio que contenían la misma solución descrita previamente, y congeladas a -70°C. Los ratones fueron observados durante dos o tres semanas y las muertes registradas.

Los mosquitos fueron descongelados y triturados en un mortero, anotando la presencia o ausencia de sangre. La suspensión fue centrifugada a 10<sup>4</sup> g por 20 minutos a 0°C, el sobrenadante distribuido en alícuotas y congelado a -70°C. Las suspensiones fueron tituladas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo con medio solidificado con agar.

### RESULTADOS

En la Tabla III podemos ver los resultados obtenidos en los experimentos de transmisión con las cepas epizoóticas venezolanas.

Obsérvese que la cantidad de virus ingerida el día 0 fue lo suficientemente alta como para infectar el 67% de los mosquitos el día 10, y 78% el día 14, con la cepa E1/68; 75% el día 14 con E123/69; y 92% el día 14 con E541/73. Transmisión del virus se obtuvo en un 75% el día 10 y 86% el día 14 con E1/68; 83%

**TABLA III**  
**RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSMISION CON TRES CEPAS EPIZOOTICAS**  
**VENEZOLANAS DEL VIRUS DE LA EEV Y MOSQUITOS *Aedes aegypti***

Cepas	Días después de alimentarse en un hamster vírico	Fraciones y porcentajes Hembras que picaron al ratón/total de hembras expuestas a ratones	Fraciones y porcentajes Hembras que picaron y contenían virus/total de hembras que picaron <sup>a</sup>	Promedio y rangos de los títulos de virus por mosquito -log <sub>10</sub> (FEP ufp) (no probados)	Fraciones y % Hembras que picaron y transmitieron el virus a los ratones <sup>b</sup> /Hembras que picaron y contenían virus
E1/68	0			5,1 4,5 - 5,4 (6) 5,1	
	10	24/35 69%	16/24 67%	3,9 - 5,9 (16) 5,0	12/16 75%
E123/69	14	9/10 90%	7/9 78%	4,9 - 5,2 (7) 4,9 4,7 - 5,1 (10) 4,8	6/7 86%
	0				
	14	8/19 42%	6/8 75%	4,1 - 5,2 (6)	5/6 83%
	18	1/8 13%	1/1 100%	4,4 (1)	1/1 100%
E541/73	0			4,7 4,6 - 4,7 (6) 4,6	
	14	26/31 84%	24/26 92%	4,1 - 5,3 (24)	17/24 71%

a Probados para determinar la presencia del virus inoculando diluciones de 10<sup>2,3</sup> y 4 de la suspensión del mosquito en FEP en medio solidificado con agar.  
 b La transmisión se evidenció por el desarrollo de enfermedad o muerte de los ratones, 6 a 9 días después de ser picados por los mosquitos infectados.  
 Los ratones fueron observados por lo menos por dos semanas.

el día 14 con E123/69; y 71% el día 14 con E541/73.

En la Tabla IV se resumen los resultados obtenidos con las tres cepas peruanas. 71D1249 infectó el 92% de los mosquitos el día 12, obteniéndose un 75% de transmisión. 71D1252 se comportó de manera singular. Los títulos del virus el día 0 fueron muy bajos, y aunque el día 15 las hembras picaron a los ratones en un alto porcentaje, sólo 7 de 28 (25%) contenían virus, lográndose tan sólo un 29% de transmisión. Con la cepa 52/73, los títulos el día 0 fueron también bajos, lo que quizás contribuyó a que sólo un 9% de las hembras resultaran infectadas; sin embargo, se logró un 64% de transmisión el día 16.

Con 59145 se obtuvieron títulos altos el día 0, lo que hizo que el 100% de las hembras resultaran infectadas; a pesar de ello, sólo un 42% transmitió la infección a los ratones a los 14 días (Tabla V).

**Significación estadística.**- No hubo diferencia estadística significativa entre los virus epizoóticos venezolanos y el peruano, ni entre los enzoóticos 71D1249 y 59145, ni entre epizoóticos y enzoóticos entre sí. Comparando los epizoóticos con cada uno de los enzoóticos, se obtuvo diferencia significativa entre éstos y la cepa colombiana ( $p = 0,25$ ) pero no con la peruana.

Entre 71D1252 y las cepas epizoóticas se obtuvo diferencia significativa ( $p = 0,008$ ), pero no con las enzoóticas.

## DISCUSION

Los ensayos de transmisión hechos anteriormente en Cornell con mosquitos *Aedes aegypti* y cepas epizoóticas y enzoóticas de Centroamérica (4) revelaron diferencias en el porcentaje de transmisión (40-70% con las enzoóticas y entre 80-100% con las epizoóticas el día 17), pero no tan marcadas como las obtenidas utilizando *Aedes taeniorhynchus* (100% con las epizoóticas y 0% con las enzoóticas). Esto podría significar que las cepas del virus epizoótico tendrían ventaja de sobrevivida sobre las cepas enzoóticas, en aquellas regiones donde el *A. taeniorhynchus* prevalece.

Si bien nuestra experiencia se limitó a mosquitos *A. aegypti*, es interesante señalar las diferencias obtenidas en el porcentaje de transmisión con las cepas estudiadas. Definitivamente *A. aegypti* no es un vector eficiente de la cepa 71D1252, lo que epidemiológicamente significaría que en regiones donde ambos coincidan, no sería muy factible el mantenimiento de un ciclo en la naturaleza.

Las demás cepas de la EEV estudiadas se comportaron de manera similar, lo cual significa que *A. aegypti* no tiene una capacidad de selección tan marcada como *A. taeniorhynchus*, y no favorecería la transmisión de una cepa sobre la otra.

Sin embargo, *A. aegypti* resultó ser un vector eficiente de las cepas epidémicas venezolanas, lo que lo haría constituirse en un buen dise-



**TABLA IV**  
**RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSMISION CON TRES CEPAS PERUANAS DEL VIRUS DE LA EEV Y MOSQUITOS *Aedes aegypti***

Cepas	Días después de alimentarse en un hamster virémico	Hembras que picaron al ratón/total de hembras expuestas a ratones	Fraciones y porcentajes	Hembras que picaron y contenían virus/total de hembras que picaron <sup>a</sup>	Promedio y rangos de los títulos de virus por mosquito -log <sub>10</sub> FEP ufp (n° probados)	Hembras que picaron y transmitieron el virus a los ratones <sup>b</sup> /Hembras que picaron y contenían virus	Fraciones y %
71D1249	0				5,6 5,4 - 5,8 (10) 4,5		
71D1252	12	13/34	38%	12/13	92%	3,7 - 5,1 (12)	9/12
	0				3,7 2,7 - 4,1 (10) 4,3		75%
52/73	15	28/33	85%	7/28	25%	3,9 - 4,9 (7)	2/7
	0				3,7 3,4 - 3,8 (10) 4,6		29%
	16	28/33	65%	11/38	29%	4,6 - 5,4 (11)	7/11

a Probados para determinar la presencia del virus inoculando diluciones de  $10^{-1,2,3}$  de la suspensión del mosquito en FEP en medio solidificado con agar.  
 b La transmisión se evidenció por el desarrollo de enfermedad o muerte de los ratones, 6 a 12 días después de ser picados por los mosquitos infectados. Los ratones fueron observados por lo menos por tres semanas.

**TABLA V**  
**RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSMISION CON LA CEPA COLOMBIANA 59145 DEL VIRUS DE LA EEV Y MOSQUITOS *Aedes aegypti***

Cepas	Hembras que picaron al ratón/total de hembras expuestas a ratones	Fraciones y porcentajes	Hembras que picaron y contenían virus/total de hembras que picaron <sup>a</sup>	Promedio y rangos de los títulos de virus por mosquito -log <sub>10</sub> FEP ufp (n° probados)	Hembras que picaron y transmitieron el virus a los ratones <sup>b</sup> /Hembras que picaron y contenían virus	Fraciones y %
0				5,0 (2) 4,9 - 5,1		
14	21/21	100%	21/21	100%	8/19	42%
				4,7(21) 4,3 - 5,4		

a Probados para determinar la presencia del virus inoculando diluciones de  $10^{-1,2,3}$  de la suspensión del mosquito en FEP en medio solidificado con agar.

b La transmisión se evidenció por el desarrollo de enfermedad o muerte de los ratones, 6 a 12 días después de ser picados por los mosquitos infectados. Los ratones fueron observados por lo menos por dos semanas.

minador de la infección entre humanos en momentos epidémicos. Esto fue corroborado en la epidemia que afectara a poblaciones del oriente venezolano en 1966 (11).

*A. aegypti* es un mosquito urbano y, debido a las fallas en las campañas de erradicación, ha reinfestado recientemente extensas zonas del Caribe y norte de suramerica (5). Esta reinvasión ha alcanzado la Guajira colombiana, y no es de dudar, aunque no tenemos datos ciertos, que en Venezuela la situación sea similar.

Es factible, por tanto, que en momentos epidémicos la diseminación del virus sea mayor si contamos con la presencia de varios vectores eficientes. Se hace necesario, entonces, un control de este mosquito que es, además, el responsable del mantenimiento y propagación del virus dengue en el Caribe y norte de Suramérica.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Hernando Groot por la cepa de Tibú y al Dr. José Madalengoitia por la cepa 52/73.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- FRANCK PT, JOHNSON KM: An outbreak of Venezuelan equine encephalomyelitis in Central America: Evidence for exogenous source of a virulent virus subtype. *Amer J Epidemiol* 94: 487-495, 1971.
- 2- HENDERSON BE, CHAPPEL WA, JOHNTON Jr. JG: Experimental infection of horses with three strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. I. Clinical and virological studies. *Amer J Epidemiol* 93: 194-205, 1971.
- 3- JOHNSON KM, MARTIN DH: Venezuelan equine encephalitis. *Adv Vet Sc Comp Med* 18: 79-116, 1974.
- 4- KRAMER LD, SCHERER WF: Vector competence of mosquitoes as a marker to distinguish Central American and Mexican epizootic from enzootic strains of VE virus. *Am J Trop Med Hyg* 25: 336-346, 1976.
- 5- Organizacion Panamericana de la Salud: Boletín Informativo sobre el Dengue en las Américas. Vol. V, Nº 1, marzo de 1976.
- 6- RYDER S, FINOL LT, SOTO ESCALONA A: Encefalitis equina venezolana. Comentarios acerca de la epidemia ocurrida en el Estado Zulia, Venezuela, a fines de 1969. *Invest Clin* 12 (39): 52-63, 1971.
- 7- SCHERER WF, DICKERMAN RW, DIAZ-NAJERA A, WARD BA, MILLER MH, SCHAFFER PA: Ecologic studies of the Venezuelan encephalitis virus in southeastern Mexico. III. Infection of mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 20: 969-979, 1971.
- 8- SCHERER WF, ANDERSON K: Antigenic and biologic characteristics of Venezuelan encephalitis virus strains including a possible new subtype isolated from the Amazon region of Peru in 1971. *Am J Epidemiol* 101: 356-361, 1975.
- 9- SELLERS RF, BERGOLD GH, SUAREZ OM, MORALES A: Investigations during Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela.

- Amer J Trop Med Hyg 14: 460-469, 1965.
- 10- SOTO ESCALONA A, FINOL LT, RYDER S: Estudio de un brote de encefalitis equina venezolana en el Distrito Páez, Estado Zulia, en octubre de 1968. Invest Clín 10 (31): 45-57, 1969.
- 11- SUAREZ OM, BERGOLD GH: Investigation of an outbreak of Venezuelan equine encephalitis in towns of eastern Venezuela. Amer J Trop Med Hyg 17: 875- 880, 1968.
- 12- SUDIA WD: Arthropod vectors of epidemic Venezuelan equine encephalitis, In Proc. Workshop-symposium on Venezuelan encephalitis virus. Pan Am Health Organ Sci Publ 243: 157-161, 1972.
- 13- WALTON TE, ALVAREZ Jr O, BUCKWALTER RM, JOHNSON KM: Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strain of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. J Inf Dis 128: 271-282, 1973.
- 14- YOUNG NA, JOHNSON KM: Antigenic variants of Venezuelan equine encephalomyelitis virus: Their geographic distribution and epidemiologic significance. Amer J Epidemiol 89: 286-307, 1969.