

BROTE EPIDEMICO DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA E

\*Rafael fragoso Uribe

\*\*Roman Czerwinski Pomrok

BROTE EPIDEMICO DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA  
EN ZACATECAS 1971-1973

DIAGNOSTICO EPIDEMIOLOGICO.- Considerando los términos de Encefalitis Equina Venezolana (EEV), al hacer el diagnóstico como una epizootia y presentarse casos en humanos, tácitamente se llega al diagnóstico epidemiológico de una epizootia y epidemia, la aparición de una epizootia de EEV en equinos, puede ser esencial o único en la historia natural de la enfermedad.

Es necesario tomar en cuenta la distribución geográfica de la EEV, y desde luego las estaciones del año, y la precipitación pluvial, que podrían en un momento dado cambiar las condiciones ecológicas por ejemplo al producir una elevación en la densidad de los mosquitos, antropófilos. La presencia de una epidemia en la cual las características de la enfermedad son: padecimiento agudo febril que se presenta generalmente en poblaciones rurales, sin casos similares en poblaciones urbanas adyacentes, asociada a baja incidencia de complicaciones del SNC, nos induce a pensar epidemiológicamente en el diagnóstico de EEV.

Un considerable número de personas que trabajan directamente con arbovirus en los laboratorios han sufrido infección de EEV, por lo que es necesario que el clínico tome en cuenta este antecedente, cuando se presente un caso dentro de un periodo de incubación compatible con el de este padecimiento.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.- La similitud de la EEV con la influenza, hace difícil el diagnóstico clínico por 1º que los antecedentes epidemiológicos tienen gran importancia. El diagnóstico etiológico definitivo, de un síndrome de encefalitis por un arbovirus solamente se puede realizar, en un laboratorio de virología.

\*Jefe del Departamento de Med. Prev.  
En el periodo 1971-1973  
Priv. De Sta. Lucia # 110, Zacatecas, Zac.  
Tel. 01 492 243 64.

\*\*Medico en servicio social en  
1973

Además de los arbovirus encefalitógenos, algunos otros agentes etiológicos producen una enfermedad parecida. El virus que con mayor frecuencia causa una enfermedad clínicamente indiferenciada de la EEV es el virus del herpes simple, esto puede sospecharse por la historia clínica de infección previa por herpes. El herpes simple no es transmitido por artrópodos, ocurre en todos los meses y estaciones del año. Habiéndose reportado en fresnillo pruebas virológicas realizadas para diagnosticar la EEV.

Cualquier infección viral en el hombre puede producir enfermedad del SNC parecida a la EEV. La meningitis aséptica y la poliomielitis no paralítica por enterovirus son causa frecuente de confusión en el diagnóstico, especialmente si coinciden con diagnóstico epidemiológico.

Una vacunación reciente contra rabia o viruela pueden ser el origen de una encefalitis post-vacunal capaz de originar una enfermedad del SNC similar a la EEV. La encefalitis post-infecciosa del sarampión, varicela, rubéola, y de otras infecciones virales también causan enfermedad del SNC semejante. La rabia y la corio meningitis linfocítica son zoonosis de etiología viral que pueden producir un síndrome clínico indistinto de la EEV, en su forma encefalítica. El diagnóstico en estos casos se establece solamente con diferenciaciones específicas en el laboratorio. Las enfermedades de origen alérgico deben ser consideradas, así como las inmunizaciones con la propia vacuna anti EEV, ya que existe la posibilidad de producir una encefalitis alérgica.

Las enfermedades no virales que deben de tomarse en cuenta en el diagnóstico diferencial en pacientes con el síndrome de

encefalitis son: cisticercosis, tos ferina, leptospirosis, tifo epidémico, tripanosomiasis, toxoplasmosis, triquinosis, esquistosomiasis, sífilis, tuberculosis, y otras meningitis bacterianas.

Por ultimo debemos tomar en cuenta en el diagnóstico diferencial, los tumores, los abscesos y las encefalopatías tóxicas que eliminaremos con una historia clínica minuciosa, examen físico, examen de laboratorio y de gabinete.

DIAGNOSTICO VIROLOGICO.- Se puede aislar el virus de la EEV de la sangre de los pacientes en estado febril agudo y también de la nasofaringe incluso hasta seis días después de la fase aguda, por lo cual cuando se sospecha este diagnóstico, se deben recolectar los especímenes y enviarlos al laboratorio de virología para establecer el diagnóstico cuya participación es esencial para un adecuado control epidémico. El aislamiento del agente causal y la determinación del aumento homólogo de ab. en sangre en estado agudo y en suero de convalecientes, respectivamente, representa la forma ideal de establecer el diagnóstico etiológico final.

Para el aislamiento del virus, aparte del suero, son útiles los órganos obtenidos por biopsia durante la fase febril aguda de la enfermedad, o bien de la autopsia. Los órganos adecuados para este fin son el pulmón, el cerebro y el bazo. En el laboratorio, los especímenes de tejido así como de sangre, se deben emulsionar inmediatamente e inocular ratones lactantes de uno a tres días de edad o ratones adultos, hámsteres recién nacidos o embriones de pollo. Para este fin también se usan técnicas de cultivo de tejido. Una parte del espécimen se guarda refrigerado para la reconfirmación.

Ocasionalmente el virus se encuentra en líquido cefalorraquídeo (LCR), cuyas células se pueden sedimentar y examinar por la técnica de anticuerpos fluorescentes.

En la mayoría de los pacientes con EEV, el LCR está normal en cuanto a número y tipo de células, sin elevación de las proteínas, aunque pueden presentarse elevadas. El aspecto del LCR es claro u opalescente. En los pacientes en que se demuestra pleocitosis, ésta alcanza de 5 a 20 células, encontrándose linfocitos tempranamente y monocitos posteriormente. El Pandy puede llegar a ser positivo. La presión del LCR suele estar elevada, especialmente en la fase temprana de la enfermedad.

El corto período de incubación de la enfermedad y la participación, súbita y fulminante del SNC, en lugares alejados de, meninges y ventrículos, quizás expliquen las anormalidades mínimas que presenta el LCR en la EEV.

El examen del LCR puede ser empero más útil para el diagnóstico diferencial demostrando una enfermedad no viral.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO.- Después de la infección el virus se multiplica principalmente en ganglios linfáticos regionales, y de aquí el virus pasa a la circulación sanguínea y a otros tejidos. El diagnóstico serológico se basa en la detección de ab. de inhibición de la hemoaglutinación (IR); del ab de fijación del complemento (FC), y de ab. de neutralización; apoyándose el diagnóstico cuando se presente un aumento significativo en la titulación de ab. estudiando sueros pareados.

Los ab. IR producen reacciones cruzadas dentro de los grupos de arbovirus, y por esta causa es necesaria la confirmación por medio de pruebas de ab. N. (47). Las pruebas con ab. FC se hace también en sueros pareados. Los ab. FC son distintos de los ab. N., estos son por lo general los más específicos para efectuar el diagnóstico del agente etiológico

## I N M U N O L O G I A

El virus de la EEV al infectar al hombre (u otro animal) provoca una producción temprana de ab. circulantes, los cuales neutralizan posteriormente los virus presentes. Los ab. formados como consecuencia de una infección por arbovirus son IH, FC y N. En general los ab. IR aparecen tempranamente y pueden durar largo tiempo; los ab. FC aparecen tardíamente y pueden durar de 2 a 5 años; y los ab. N aparecen tempranamente y son de larga duración. Los ab. IR y FC son importantes en el diagnóstico, pero únicamente el ab. N es el de protección, y es el más específico.

La infección con el virus de la EEV induce la producción de ab. homólogos así como ab. heterólogos hacia otros virus del mismo grupo. La recuperación de una infección por un arbovirus puede traducirse en una resistencia a infecciones subsecuentes por otros virus del mismo grupo, como los Pixuna, Mucambo, y probablemente a otros. La protección cruzada que resulta de infecciones por otros virus, probablemente modifica el cuadro clínico de la enfermedad, más que evitarla.

INHUNIDAD ACTIVA.- Los ab. comienzan a producirse desde el primer día de la infección, llegando a concentraciones más elevadas durante la tercera semana, y disminuyen paulatinamente. A menudo se encuentran por muchos años después, en el suero de personas que se recuperan de la enfermedad. La inmunidad activa es el resultado de la producción de ab. N.

No está muy claro el mecanismo de la producción constante de anticuerpos a largo plazo, sin embargo la persistencia de inmunidad no

depende exclusivamente de infecciones exógenas. Es aparente la producción y persistencia de ab. A largo plazo, incluso durante muchos años, debe de provenir de algún estímulo y es probable que se trate de un "pro virus" equivalente a un virus completo, información que se incorpora a la estructura del ADN celular (genética), y así estimula la formación persistente de los ab.

La inmunización con vacuna viva atenuada produce inmunidad activa, la cual no es tan persistente como la inmunidad desarrollada después de una infección natural.

INMUNIDAD PASIVA.- La inmunidad pasiva en el niño es transmitida por vía placentaria en madres inmunes, más bien que por la leche materna, ya que los ab, en ocasiones desaparecen del suero del niño durante el curso de la lactancia, La inmunidad pasiva aparentemente esta presente en los recién nacidos de madres inmunes a EEV.

Al parecer los potros a los seis meses ya deben estar libres de ab. Maternos (63).

La vacuna inactivada parece producir un grado de inmunidad activa temporal. El uso de vacuna inactivada seguida de vacuna atenuada parece amortiguar el efecto de reacciones sistémicas, causadas por esta ultima induciendo asimismo una inmunidad de carácter más permanente en el hombre (38).

Se ha comprobado que la globulina gama heteróloga de conejos inmunes protegió a ratones infectados por vía subcutánea o respiratoria, a quienes se les aplico una dosis letal de virus de EEV. 12 En este mismo estudio se demostró que en algunos individuos con inmunidad pasiva se presenta inmunidad activa después de la infección con virus de EEV.

Con inmunidad pasiva se puede proteger efectivamente al personal de laboratorio no vacunado, administrándosele globulina gama en las primeras, 24 después de la infección accidental de EEV, (incluyendo la infección por vía respiratoria).

## CONTROL DE LA EEV.

El control de la epizootia y epidemia de EEV consiste en: (a) control del vector; (b) inmunización; (c) control del ambiente y (d) quimioterapia.

(a) CONTROL DEL VECTOR.- La eliminación del vector en las zonas enzooticas por el momento es el método más efectivo de control, este se efectúa teniendo como objetivo cambios de condiciones ecológicas. Un aspecto importante es la eliminación de las aguas en que se desarrollan mosquitos. En el Estado de Zacatecas durante el periodo de la epizootia y epidemia 1971-1972, para el control del vector se aplicaron las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud: 1.- Control de las formas adultas del vector, diseminando insecticida tipo malathión, por medio de avionetas, habiéndose cubierto un total de 56,520 hectáreas; 2.- Control de las formas larvarias por medio de petrolización de charcos y pantanos, habiéndose consumido un total de 2,855 litros diesel, y por medio de la desecación de aguas; 3.- Rociado intra y peri domiciliario con DDT., habiéndose aplicado un total de 39,282 Kg.

(b) INMUNIZACION.- Se ha obtenido un progreso considerable con el uso de vacunas. La primera vacuna contra la EEV fue una preparación de cerebro de caballo-infectado, inactivada con formalina. Le siguieron vacunas inactivadas preparadas en embrión de pollo (3), habiéndoseles utilizado extensamente en las epidemias ocurridas en América del Sur. En 1952 fue preparada una vacuna trivalente (EEV, EEO, EEE) inactivada con formalina, para el uso de personal de laboratorio pero con esta vacuna ocurrieron algunas infecciones humanas de EEV (5).

Otra vacuna, irradiada por rayos gama protegió efectivamente a caballos de la BEV, que fueron infectados por medio de aerosoles (45).

Desde 1969 una vacuna viva atenuada del virus EEV, cepa TC-83 proveniente de un equino de Trinidad (2, 38). estuvo en uso experimental; esta vacuna en Centro América protegió eficazmente a los equinos (18, 55, 62). La misma vacuna TC-83 se usó con éxito en los equinos en el Sur de los Estados Unidos, controlándose la epizootia.

Otros estudios atestiguan la eficacia de la vacuna TC-83

(1) que induce inmunidad efectiva por largos periodos de tiempo, comprobándose la persistencia de ab. Por lo menos durante 30 meses (63);

(2) que no causa lesiones permanentes en el SNC en los caballos (39).

(3) que no hay reversión del virus vacunal (TC-83) a la virulencia (35);

(4) que la transmisión del virus vacunal TC-83 no ocurre de (equino-equino o equino-mosquito-equino) (60, 62).

Independientemente de la vacunación de equinos adultos, se debe dar prioridad a la inmunización de potros mayores de 6 meses de edad, los cuales a partir de esta edad han perdido los ab. Maternos (63).

La protección de empleados de laboratorio que trabajan con virus EEV ha sido efectiva con la vacuna TC 83. En un estudio con voluntarios vacunados con esta cepa, ocurrieron reacciones adversas, presentándose reacciones sistémicas en el 40 % de personas inoculadas con vacuna TC-83 (pasada consecutivamente 50 u 80 veces en células de corazón de feto de cobayos), estos voluntarios habían recibido previamente varias dosis de vacuna inactivada. En los voluntarios vacunados con esta cepa, pero que no recibieron vacuna inactivada con anterioridad, la ocurrencia de reacciones sistémicas fue del 85% (38).

En el Estado de Zacatecas, el 10 de Agosto de 1971, se inició la vacunación de equinos en forma masiva y para el 31 de Octubre se habían vacunado 377,892 equinos.

(c) CONTROL DEL AMBIENTE.- El control del ambiente es de gran importancia en el control de la EEV. Se deben aplicar las medidas de cuarentena a los equinos. Para prevenir infecciones humanas en zonas epidémicas las medidas de protección personal pueden ser eficaces. El aislamiento de los enfermos debe llevarse a cabo, hasta donde sea posible, para evitar la transmisión por contacto y por medio de vectores. El control del ambiente es particularmente importante en los trabajadores de laboratorio con la EEV.

(d) QUIMIOTERAPIA.- No hay en el presente una terapia efectiva capaz de modificar la infección EEV, pero están llevándose a cabo extensos estudios farmacodinámicos in vitro e in vivo, específicamente Contra EEV con puromicina (70) actinomicina D (20) Y otros quimioterapeúticos. Los resultados preliminares demuestran que estos compuestos inhiben la reproducción viral. Estas investigaciones están aún sujetas a pruebas y evaluación.

#### EEV EN MEXICO y ZACATECAS.

En 1961 el Instituto Nacional de Virología (INV), inició un Programa con el objeto de investigar y evaluar la importancia de los arbovirus en la República Mexicana (13, 49). En 1962 de Mucha Macías, obtuvo la primera evidencia serológica de EEV en Champotón, Campeche, al encontrar anticuerpos IR y N en el suero de un joven de 16 años, esta persona presentaba secuelas neurológicas consecutivas a un síndrome febril reciente. 14 En 1963 el virus fue aislado por primera vez en Sontecomapan, Ver., a partir de hámsteres y ratones jóvenes como animales centinelas, así como de mosquitos culex eclambdis y culex coronador

(48).

En 1964, en el Sureste (Chetumal, Tabasco, Tlacotalpan Veracruz y Yucatán) de Mucha Macías y col. (15) comprueban que la población humana de esa zona, probablemente había estado expuesta al virus de la EEV alrededor de 1961, encontrándose una actividad viral reciente, siendo el suero de un escolar de 10 años negativo en 1961 y positivo en 1963. A fines de Septiembre de 1966 se presentó un brote de EEV en el Sur de

Tamaulipas y Norte de Veracruz reportándose aproximadamente 1,000 caballos enfermos, con una letalidad del 30 %, habiendo concluido que el reservorio fue una rata cañera de la especie Sigmodon hispidus (40).

En 1967 en el INV en un estudio serológico en seres humanos y animales (en toda la faja costera del Golfo, en el SE, Chiapas y Oaxaca, California Norte, Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco se demostró la presencia del arbovirus del grupo A y del grupo B. En la meseta Central, Distrito Federal, Coatepelco y Xochimilco, el porcentaje de positivos resultó sensiblemente inferior (16).

En Junio de 1969, se presentó un brote al Norte de Honduras y al Sur de Guatemala a 100 km. de Tapachula, Chis. A fines de Agosto de ese año se reportó un brote en los Municipios de San Vicente Carbonero Chicomucelo, Comalapa del Estado de Chiapas, con un total de 150 Caballos muertos. A principios de 1970, en Chiapas se reportó la existencia de una epizootia y epidemia y en Junio del mismo año también se presentó un brote con alta mortalidad de equinos (42). En 1971, se notificaron en México 16,800 casos de EEV en seres humanos con un acentuado predominio rural (10), siendo más del 70 % en San Luís Potosí y el 15 % en Tamaulipas.

La Encefalitis Equina Venezolana, Brotes por Estado y Año se ilustra en (Mapa No. 2).

La EEV en México, se creía que se presentaba principalmente en las tierras bajas, como son las Costas del Golfo de México y Pacífico. Su

actividad máxima situándose particularmente en alturas entre el nivel del mar y hasta los 1,500 metros. Las zonas situadas por debajo de dicha altitud, se dice que reúnen las condiciones ecológicas más propicias para la existencia del virus y para su (3) transmisión o sea el desencadenamiento de brotes epizooticos y epidémicos. A alturas mayores se llegó a mencionar que los casos presentes en estas altitudes probablemente serian importados de las zonas bajas o bien por acarreo mecánico de artrópodos infectados (10).

En el Estado de Zacatecas, las condiciones ecológicas siempre se consideraron adversas al desarrollo de EEV. (Ver próximo Capítulo: DATOS ECOLOGICOS DEL ESTADO DE ZACATECAS.) Sin embargo a partir del 23 de Julio de 1971, se detectó la EEV en equinos, con una elevada tasa de mortalidad equina (30 36x1000), al investigar el brote epizootico, se vio que coincidía con la presencia de casos en humanos, sospechosos de padecer EEV.

Los primeros casos detectados tanto en equinos como en humanos fue la comunidad de Rió Florido, considerándose esta fecha y lugar como el inicio del brote, epizootico y epidémico. Siguiendo las localidades de Potrero y El Palmar (21,23), del Municipio de Fresnillo, Zacatecas.

A partir de esta fecha continuaron presentando defunciones en equinos y casos en seres humanos, la enfermedad se diseminó en forma rápida hasta abarcar la mayor parte del Estado de Zacatecas. Afectando 19 Municipios (Anexo No. 1) y (Mapas Nos. 3 y 4) con 133 localidades y reportándose casos en seres humanos, en 90 de las localidades, abarcando una área de 31 269 Km<sup>2</sup>.

Del 23 de Julio al 25 de Septiembre de 1971, en el Municipio de Fresnillo se registraron 932 muertes de equinos por probable EEV (Cuadro No. 1), y del 29 de Julio al 7 de Octubre de 1971, se registraron 369 casos humanos atribuidos a esta enfermedad (Cuadro No. 2). El número total de muertes de equinos por probable EEV, que se presentó en el Estado de Zacatecas del 23 de Julio al 31 de Octubre de 1971 fue de 1999, y de 822 casos humanos atribuidos a este padecimiento, sin haberse presentado defunciones, incluso durante los siguientes años, hasta la fecha.

## DATOS ECOLOGICOS DEL ESTADO DE ZACATECAS.

El Estado de Zacatecas se encuentra a una altitud superior a los 1,500 mts., sobre el nivel del mar, con una altitud promedio de 2,100 mts. (de 2,000 mts., a 2,500 mts.) Sobre el Nivel del Mar (SNM).

La precipitación pluvial media anual es de 361.6 mm., pero para el año de 1971 la intensidad fue de 600 mm. La presión atmosférica es de 779 mm. Las temperaturas máximas y mínimas que se registran varían desde 35° C a -5° C. - La humedad atmosférica generalmente es baja en la mayor parte del año, llegando a ser hasta de un 50 %.

Los vientos dominantes son de seis meses de duración (de Noviembre a Mayo), los cuales soplan con dirección NE.

Se seleccionó el Estado de Zacatecas, específicamente el Municipio de Fresnillo, para llevar a cabo el estudio clínico y epidemiológico de la EEV, debido a que en esta zona se encontraba en -- 1971-1972, un brote de EEV en desarrollo y además, por sus características ecológicas se suponía difícil la presencia de la enfermedad.

El Municipio de Fresnillo, se encuentra ubicado en los paralelos; Latitud Norte 23°10'35" Y Longitud Oeste 102°52'39" del Meridiano de Greenwich, siendo la altitud sobre el nivel del mar en dicha región de 2,100 a 2,300 metros. El Municipio de Fresnillo es un importante centro ganadero del Estado, existiendo en la localidad una Empacadora de Carnes.

La población total del Estado en el año de 1972 fue de --- 986,455 habitantes y del Municipio de Fresnillo de 103,405. La densidad de población por kilómetro cuadrado por habitante es de 5.49. La población total del área afectada por Municipio, edad y sexo, se

presenta en el Anexo No 1. La población total del Municipio de ~  
Fresnillo por grupos de habitantes se presenta en el Cuadro No. 3.

La población equina en el Estado en ese momento, fue de 412,188, en el Municipio de Fresnillo es de 32,000 y en el área afectada es de 197,862.

La relación entre el número de habitantes y de equinos por kilómetro cuadrado es de: 2.19 habitantes por Un equino.

El brote epizootico y epidémico de la EEE de 1971-1972 provoco grandes perdidas económicas y ha sido un problema de Salud-pública.

INVESTIGACION EPIDEMIOLOGICA DE LA EEV EN FRESNILLO:  
EN CONJUNTO CON EL GRUPO DE ESTUDIO DE LA ESCUELA DE SALUD  
PUBLICA, EL INSTITUTO NACIONAL DE VIROLOGIA, EL DEPARTAMENTO  
DE ECOLOGIA DEL IPN Y DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
TROPICALES Y DESDE LUEGO LOS SERVICIOS COORDINADOS DE SALUD  
PUBLICA DEL ESTADO.

DESARROLLO DE LA INVESTIGACION DE CAMPO:

I. - M A T E R I A L Y M E T O D O .

A. ESTUDIO ENTOMOLOGICO.

- (1) Recolección de muestras de larvas.- Se recolectaron muestras de larvas contenidas en agua de lagunas, estanques, pantanos, pozos, depósitos de agua, presas, ríos, etc., para demostrar la presencia de larvas de mosquitos transmisores.
- (2) Captura de mosquitos.- La captura se hizo por medio de trampas de luz modelo CDC (Comunicable Disease Center) 57 colocadas en el campo, de 18:00 p.m., hasta las 7 a.m., en las orillas de lagunas, carreteras, criaderos, potreros y otros puntos - estratégicos de las poblaciones circundantes. Los mosquitos una vez capturados fueron anestesiados con cloroformo y mantenidos congelados en cajas de petri para ser clasificados y colocados en tubos de vidrio, los que se cerraron con tapón de hule y tela adhesiva y se almacenaron refrigerados. El material recolectado de esta exploración se envió al laboratorio de Entomología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. (Instituto Politécnico Nacional), para la identificación de las especies.

B. ENCUESTA SEROLOGICA.

- (1) Para el diagnóstico serológico de EEV, se hizo una encuesta en la zona afectada seleccionando la muestra en base a la -- frecuencia esperada de la enfermedad (P); la precisión deseada (S); y las características de la población humana, de acuerdo a la siguiente fórmula: N = Tamaño de la muestra.

$$SP=2 \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}} \quad N= \frac{P(1-P)}{S^2 P^2}$$

padecer EEV, se tomó una muestra de exudado con un hisopo estéril el cual fue depositado en un frasco estéril conteniendo 2 cc. de solución salina estéril con 100 U. de Penicilina cristalina y 100 microgramos de estreptomycin por mililitro. Los tubos se cerraron con tapón de hule estéril y tela adhesiva, depositándoseles en congelador eléctrico o en hielo seco, conservándoseles congelados hasta el momento de su estudio. El número de muestras de exudado fue de 369.

- (3) El procedimiento a seguir para el aislamiento del virus es el siguiente:

Diluir el exudado 1:5 en una solución de albúmina de bovino, (Fracción V) al 0.75 %, centrifugarlo a 3000 rpm., e inocular intracerebralmente a ratones lactantes con 0.01 ml. de la dilución. Extraer los cerebros de los ratones que enfermen o mueran durante los 14 días subsecuentes a la inoculación. Triturar los cerebros así obtenidos y suspenderlos en albúmina de bovino (Fracción V) al 0.75 % en una dilución 1:10 a la que se debe añadir 100 U de Penicilina cristalina y 100 mgs. de estreptomycin por ml. Volver a inocular la suspensión centrifugada a la misma dosis a otra camada de ratones. Después de 5 ó 6 pases en cerebros de ratón, inocular las suspensiones en cultivos de tejidos de embrión de pollo y observar el efecto citopático, si este fuera positivo, inocular el líquido sobrenadante nuevamente a otras camadas. Posteriormente se procede a la titulación de los virus encontrados para efectuar pruebas N, con fines de identificación.

Los resultados de este ultimo estudio no esta disponible.

- (4) El procedimiento a seguir para identificación del virus es el siguiente:

De los últimos cerebros de ratones cosechados, hacer diluciones de 10 a la menos 1 a 10 a la menos 11 inoculando cada una en 3 tubos de cultivo de tejidos de embrión de pollo para incubarlos a 37° C y al tercer día observar el efecto citopatogénico y determinar el título de los virus.

Una vez determinado el titulo del virus, mezclar diluidos 1 a 10, con suero-virus e incubarse 1 hora a 37° C, inocular 3 tubos de células embrionarias de pollo, teniendo de referencia la titulación de cada prueba. Guardar los tubos a 36° C observando si se presentó efecto citopatogénico hasta el tercer día post-inoculación., Determinándose así el índice de neutralización EEV del suero en prueba. Los resultados del estudio de aislamiento no están disponibles por el momento.

## II.- ESTUDIO ENTOMOLOGICO:

El estudio entomológico en el Municipio de Fresnillo demostró la presencia de criaderos de vectores en las márgenes de lagunas, pantanos, etc., habiéndose demostrado la presencia de larvas en la siguiente orden de frecuencia: Aedes sp; Culex sp.; Psorophora sp.; Anopheles sp.

El índice larvario por calada (ILC) para Aedes sp. y Culex sp.; fue hasta de 500 larvas; de Psorophora sp. hasta 30, y de Anopheles sp. hasta 10.

La captura de mosquitos llevada a cabo en la orilla de la carretera que va de la Estación de FF.CC., de Fresnillo a Santiaguillo como a 500 metros de la población (El Palmar), se efectuó con las lámparas trampa CDC, obteniendo un alto índice vectorial del orden de 37.5 mosquitos por hora, en el lapso de tiempo de 18:00 p.m. hasta las 7:00 a.m. En el poblado de Río de Medina se encontró un IV de 8.9 mosquitos. A la orilla de una laguna en Rancho Nuevo, se obtuvo un I.V. de 5 mosquitos. Otros I.V. fueron de 0 a 37.5. El material recolectado de este estudio se conserva en el I.P.N., para la identificación de especie.

Se observó que debido a las medidas de control tomadas contra el vector, así como a los cambios ecológicos adversos al - transmisor en relación con las diferentes estaciones del año, las muertes en equinos y los casos humanos estuvieran en una relación directamente proporcional a la densidad del vector.

### III.- ENCUESTA SEROLOGICA EN HUMANOS.

El 30 de Abril de 1973 el I.N.V., de la S.S.A., reportó resultados parciales de los 700 sueros de seres humanos estudiados con el fin de diagnosticar y conocer el estado inmunológico, demostraron la presencia de ab. IH., para el virus de la EEV; los títulos positivos variaron de 1:10 a 1:40. Estos resultados parciales son: 4, negativos 10, 1:10; 3, 1:20; 3, y 1:40; 3 (Anexo No. 2.), demostrando la actividad del virus de la EEV en la población humana, lo que consideramos como prueba de la existencia de EEV en el área estudiada, debido a que las pruebas realizadas con los otros dos ab. (EEE y ESL) resultaron negativas.

### IV.- ESTUDIO CLINICO y AISLAMIENTO DEL VIRUS.

En el periodo del 29 de Julio al 7 de Octubre de 1971 se reportaron en el Municipio de Fresnillo, 369 casos humanos con un diagnóstico probable de Encéfalo mielitis Equina Venezolana (EEV).

Del estudio efectuado en 106 historias clínicas de pacientes sospechosos de padecer EEV, llevado a cabo del 29 de Julio al 17 de Septiembre en el municipio de Fresnillo, se reportaron los siguientes signos y síntomas; (Modelo de la historia clínica de esta encuesta se incluye en el Anexo No. 3.,4.). 1) fiebre, 96.2 %; 2) cefalea, 96.2 %; 3) anorexia, 96.2 %; 4) mialgias, 91.5 %; 5) congestión faringea 88.6 %; 6) congestión conjuntival, 81.1 %; 7) temblores, 73.5 %; 8) paresias 71.6 %; 9) somnolencia 68.8 %; 10) vómito 54.7 %. Los otros síntomas están registrados en el Cuadro No 7.

Estas manifestaciones clínicas no se pueden considerar como características de EEV, pero en base de los hechos epidemiológicos se admiten como casos probables de EEV, ninguno de ellos presentó secuelas del padecimiento. Los enfermos distribuidos por edad y tasa por 10,000 habitantes se registran en el Cuadro No. 6. El grupo más afectado fue el que tuvo relación con animales, o bien el que estuvo más expuesto a la picadura de vectores.

Las muestras de exudados oro faríngeos para el aislamiento del virus fueron positivas identificando el virus de la EEV.

## V.- DISCUSION.

A.- En el Estado de Zacatecas antes del 23 de Julio de 1971 no existían antecedentes epizoóticos del padecimiento (EEV). Se piensa que a partir de la fecha antes mencionada fue cuando se inició la epizootia, la cual pudiese persistir como una enzootia, en caso de que las condiciones ecológicas fueran favorables constantemente hacia el futuro para permitir la existencia permanente del ciclo biológico del virus en la naturaleza.

Se pudo establecer que las primeras muertes de equinos por EEV ocurrieron el día 23 de Julio de 1971 en El Potrero El Palmar, situado en el Municipio de Fresnillo, confirmándose por medio de laboratorio que 108 equinos habían muerto de (22) EEV. Dicho Potrero es utilizado como agostadero por las poblaciones circunvecinas, sin embargo es probable que el obtener equinos de San Luis Potosí, para su sacrificio y comercialización en la empacadora de Fresnillo, haya sido el origen o la fuente de infección de la epizootia y epidemia.

Los primeros casos sospechosos de EEV en humanos fueron identificados el 29 de Julio del mismo año en Río Florido, en el poblado de San Isidro, a 5 km. de Potrero El Palmar, todos ellos manifestaron haber estado en contacto una semana antes con los animales que murieron de esta enfermedad.

En el Estado de Zacatecas del 23 de Julio al 31 de Octubre ocurrieron 1999 muertes de equinos por probable EEV, en este mismo lapso de tiempo ocurrieron 822 casos en humanos, en los que no se reportaron defunciones atribuidas a EEV. La distribución mensual de casos humanos en el Estado fue de 14 en el mes de Agosto; 556 en el mes de Septiembre, y solamente se reportaron 107 casos en el mes de Octubre

Durante Noviembre y Diciembre de 1971 se presentaron esporádicamente defunciones equinas (22,23) Y algunos casos de la enfermedad en humanos.

En el año de 1972 ocurrieron 205 defunciones de equinos, de los cuales 161 fueron comprobados clínicamente como EEV, reportándose solamente un caso humano el cual fue diagnosticado clínicamente, también como EEV. Los últimos casos notificados de defunciones de equinos se reportaron el primero de Agosto de 1972, tomando esta fecha (59), como en la cual se dio como finalizado el brote.

A partir de entonces, hasta el año de 1973 no se han diagnosticado, en el Estado de Zacatecas, casos de EEV ni en equinos, ni en seres humanos.

B.- Del análisis retrospectivo de la epizootia y epidemia ocurrida en 1971-1972, se concluye que la probable fuente de origen fueron equinos traídos de San Luis Potosí a Río Florido en la localidad de potrero de El Palmar y a partir de aquí se diseminó por todo el Municipio de Fresnillo y a otras localidades en el Edo.

La EEV estaba ocurriendo en el mes de Julio de 1971 en los Estados de San Luis Potosí, Jalisco, Coahuila y Durango (colindantes del Edo. de Zacatecas), y en fecha reunían las condiciones ecológicas adecuadas para el desarrollo de la EEV, debido a que la época de lluvias fue más prolongada y la precipitación pluvial fue mayor, por lo que aumentaron las aguas superficiales existentes (charcos y represas) y se formaron depósitos favorables para la proliferación de los vectores, cuya identificación resultó ser la siguiente: Culex sp., Aedes sp. Anopheles sp. y Psorophora sp. todos capaces de transmitir EEV.

Es factible que la transmisión del virus de la EEV en el Estado

de Zacatecas se haya diseminado de áreas circunvecinas por una o más de las variables que componen la zoonosis: o sea; 1.- a partir de la población susceptible (equina y humana); 2.- por vector mosquito; 3.- por reservorios vertebrados silvestres o domésticos; 4.- por los cambios ecológicos favorables, y que el virus se adaptó a la nueva área ecológica. La actividad del virus fue de una elevada virulencia para los equinos y fue transmitido a los seres humanos en una forma clínica atenuada;

C.- Anteriormente se había insistido que la transmisión de la EEV a más de 1.500 mts. de altitud era muy poco factible pero se observó que en Zacatecas la altitud no fue determinante como un solo factor ecológico y en cambio dicha transmisión dependió más de las otras variables ecológicas ya mencionadas.

Nos permitimos atribuir al virus de la EEV el papel de agente etiológico en la epizootia y epidemia que se presentó en el Estado de Zacatecas en 1971-1972. lo que se comprueba con los estudios llevados a cabo: (A) Presencia abundante del vector transmisor. (B) Presencia de ab. IH., para el virus EEV en los sueros de seres humanos y de equinos. (C) Diagnóstico clínico de enfermedad EEV en los humanos y equinos, (D) el haberse diagnosticado anteriormente por métodos clínicos y de laboratorio, la presencia de ab. IH., de EEV y la enfermedad en equinos, de los cuales incluso fallecieron 22 por este padecimiento. Este último estudio fue llevado a cabo por laboratorio del Instituto Nacional Pecuario en Palo Alto Estado de México.

## VI.- SUGERENCIAS.

Debido a que existe la posibilidad de que la EEV persista como una enzootia en el Estado de Zacatecas, se hacen las siguientes recomendaciones: 1.- es necesario llevar a cabo una Vigilancia Epidemiológica adecuada, para lograr el control de futuros brotes, y consecuentemente evitar que se presenten casos o brotes epidémico en el Estado, 2.- en las medidas de control de la enfermedad, se comentó, que el método más efectivo de control es la eliminación del vector, 3.- nuestras observaciones nos sugieren, que debido a las características ecológicas modificadas, consistente en una precipitación pluvial inusualmente elevada, lo que provoco la formación de múltiples acumulaciones de agua, situación que por si y consecuentemente provoco, una elevación en la densidad de mosquitos. Consideramos que éste fue el factor más importante y determinante para el desarrollo de la epizootia y epidemia, 4.- en lo que respecta a la variable vector, es conveniente que se lleven a cabo las medidas de control erradicación, y que se continúen haciendo estudios entomológicos, en áreas seleccionadas del Estado, así mismo que se este alerta o sea llevar a cabo la vigilancia de cambios ecológicos, estudio de reservorios, etc., lo que es factible de realizar conjuntamente con personal de la Dirección de Entomología, en coordinación con personal de esta especialidad del I.p.N., con el fin de obtener un resultado más aceptable, Científicamente, 5.- en loo que respecta al control de la variable población susceptible (equina y humana): se recomienda se desarrollen las siguientes actividades: a), Levantamiento de un Censo de población equina (actualizándola año por año y desde luego conocer su movilidad, dentro y fuera del Estado. b) Que dentro del control de la enzootia se lleve a cabo la determinación de los títulos de ab. en equinos, año por año para determinar el grado de protección, c) y vacunar anualmente a todos los equinos inmunológicamente susceptibles, d.- Tener una comunicación permanente con personal de Ganadería del Estado, y con el I.N.V. para recibir una orientación oportuna y adecuad

En relación a la virulencia del virus de la EEV y desde luego una coordinación y cooperación adecuada y oportuna, para aplicar las medidas de control pertinentes, e.- Se sugiere efectuar un estudio longitudinal los los pacientes sospechosos de padecer EEV, para determinar si este padecimiento dejó secuelas con lo que se podría evaluar la patogenicidad de la EEV en los seres humanos en la epidemia de 1971-1972, información que será de gran interés.

B I B L I O G R A F I A

1. ANDREWES. C. Sir. and Pereira. R.G. Viruses of vertebrates. 3rd. Ed. Bailliere Tindall. London. 1972.
2. BERGE. T.O., Banks, I.S. and Tigertt, W.D. Attenuation of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus by in Vitro Cultivation in Guinea Pigs Heart Cells. Am. J. Hyg., 73: 209-218. 1961.
3. BYRNE, R.J., French. G.R., Yancey. F.S., Gochenour, W.S. Fussell. P.K., Ramsburg. R.H., Brand, O.A., Scheider, and Buescher. E.L. Clinical and Immunological Inter-relationship among Venezuelan. Eastern and Western Encephalomyelitis Viruses in Burros. Am. J. Vet. Res. 25: 24-31. 1964.
4. CASALS, J. The Arthropod-Borne Group of Animal Viruses. Transactions of The New York Academy of sciences (2) 19: 219-235. 1957.
5. CASALS. J. Procedures for Identification of Arthropod-Borne Viruses. Bulletin of the World Health Organization 24: 723-734. 1961.
6. CECIL-LOEB. Textbook of Medicine. Beeson. P.B. and McDermott. W. Eds. Twelfth Edition. 90-94. 1967.
7. CECIL-LOEB. Textbook of Medicine. Beeson, P.B. and McDermott, W. Eds. Twelfth Edition. 98-100, 1967.
8. CHAMBERLAIN, R.W. Kissling, R.E., Stanim, D.D., Nelson, D.B., and sikes, R.K. Venezuelan Equine Encephalomyelitis in wild Birds. Am. J. Hyg., 63: 261-273. 1965.
9. CITAMBERLAIN, R.W., Sudia, W.D., Coleman, P.H., Work, T.R., Neuhouse, V.F., and Johnston. J.G. Jr., Arbovirus Studies in south Florida. with Emphasis on Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. Am. J. Epidem., 89: 197-210, 1969.
10. CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES. S.S.A. MEXICO, 1971. CORRISTAN, E.C., LaMotte, L.C. and Smith, D.G. Susceptibility of Bats to Certain Encephalitis Viruses. Federation Proceedings 15: 584, 1956.
12. DANES, L. and Eruskova, J. Efficiency Testing of Passive immunization Against Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Mice. Acta. Virol 13:554-556, 1967.
13. DE MUCHA MACIAS, J. Estudios Epidemiologicos Sobre Virus Arbo en el Sureste de México. Salud. Publ. Mex., 5: 523-527, 1963.
14. DE MUCHA MACIAS, J. Infecciones por Virus Arbo. Estudios Realizados en el Instituto Nacional de Virologia de la S.S.A. Gac. Med. Méx. 39: 415, 1963.
15. DE MUCHA MACIAS, J., Sánchez-Spindola, I. y Campillo-Sainz, C. Venezuelan Equine Encephalomyelitis Antibodies in Human Beings of Southern Mexico. Am. J. Trop. & Hyg. 15: 364, 1966.
16. DE MUCHA MACIAS, J. arbóvirus en la Republica Mexicana. Cac. Med. Mex. (97n) 1398-1403, 1967.
17. DE MUCHA MACIAS, J., and Sanchez-spindola, I. Two Human Cases of Laboratory Infection with Mucambo Virus. Am. J. Trop. Med. & Hyg: 14: 475-478, 1965.

18. EDDY. G.A., Martin. D.B., Reeves. W.C., and Johnson, K.M.  
Field Studies of on Attenuated Venezuelan Equine  
Encephalomyelitis Vaccine (strain Tc-83). Infect.  
Immun. 5: 160-163, 1972.
19. EBRENKRANZ, N.J., Sinclair. M.C., Buff, E., and Lyman, D.O.  
The Natural Occurrence of Venezuelan Equine Encephalitis  
in the United States. New England J. Med. 282:  
298-302, 1970.
20. ERSHOV; F.I., Zhdanov, V.M. and Tsareva. A.A. Reproduction of  
Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in Cells  
Treated with Actinomycin. (Rus. Eng. Abstract)  
Antibiotiki 10, No. 3: 250-55. Moscow USSR. 1965.
21. FRAGOSO, U.R. y Diaz, A.E. Protocolo de Investigacion Epidemiol-  
ogica Retrospectiva de la Encefalitis Equina de  
Venezuela. Fresnillo, Zac: S.S.A., Escuela de Salud  
Pública:  
1971
22. FRAGOSO, U.R. y Perez, A.L.A. Informe Final en Relacion a la  
Encefalitis Equina de Venezuela en el Estado de  
Zacatecas Durante el Año de 1971. servicios Coordinados  
de Salud Publica en el Estado. Departamento Tecnico.  
Subjefatura de Programas Preventivos. Seccion de  
Zoonosis. 1971.
23. FRAGOSO, U.R. y Diaz, A.E. Informe de la Investigacion Epide-  
miologica Retrospectiva de la Encefalitis Equina  
de Venezuela en el Area de: Fresnillo, Zacatecas.  
S.S.A. Escuela de Salud Pública. 1971.
24. FRANCK. P.T., and Johnson. K.M. An Outbreak of Venezuelan  
Equine  
Encephalomyelitis in Central America; Evidence for  
Exogenous Source Of a Virulent Virus Subtype. Am.  
J. Epidemiol. 94: 487-1-95. 1971,
25. GILYARD, R.T. Mosquito Transmission of *Venezuelan* Virus Equine  
Encephalomyelitis in Trinidad. Bulletin of the U.S.  
Army Medical Department No. 75: 96-107, 1944.
26. GRAYSON, M.A., and Galindo. P. Ecology of Venezuelan Equine  
Encephalitis Virus in Panama. Journal of the Am.  
veterinary Medical Association. Vol 155. No. 12: 2141-  
2144. 1969.
27. HOFF, G.L. and Trainer, D.O. Experimental Infection of Venezuelan  
Equine Encephalomyelitis Virus in White-Tailed Deer.  
Am. J. of Epidem. Vol. 96, No. 5: 1972.
28. HRUSKOVA. J., Danes, L., Kliment, V. Venezuelan Equine  
Encephalomyelitis Virus Determination of Inhalation  
LD 50 For Guinea Pigs and Mice. Acta Virol. 13: 203-  
208, 1969.
29. HRUSKOVA, J., Danes, L., Jelinkova, A., Kruml, J., Rychterova.  
V. Experimental Inhalation Infection of Mice with  
Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. Acta Virol.  
13: 560-563, 1969.
30. JOHNSON.K.M., Shelokov, A., Peralta, P.R., Dammin. G.J., and  
Young. N.A. Recovery of Venezuelan Equine Encephalomyelitis  
Virus in Panama: A Fatal Case in Man. Am.  
J. Trop. Med., 17: 432-440, 1968.
31. KISSLING. R.E., Chamberlain, R.W., Nelson, D.B., and stamin, D.  
D. Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Horses.  
Am. J. Hyg., 63: 274-287, 1956.

32. KISSLING, R.E., and Chamberlain, R.W. Venezuelan Equine Encephalitis. *Advances in Veterinary Science*. Vol II, 65-84. Academy Press, 1967.
33. KUBES, V., and Rios, F.A. The Causative Agent of Infectious Equine Encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 90: 20-21, 1939.
34. LEVI CASTILLO, R. The Problem of Human and Equine Encephalomyelitis in Ecuador. *Acta Trópica* 9: 77-80, 1952.
35. LUEDKE, A.J., Barber, T.L., Foster, M.N., Batalla, D. and Mercado, S. Effect of Back Passage of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Te-83 Vaccine Virus on Clinical, Virologic, and Immune Responses in Horses. *J.A.V.M.A.*, Vol 161. No.7: 824-831, October 1, 1972.
36. MANSON'S TROPICAL DISEASES. WilCOCKS & Manson-Bahr, 17th Edition. Bailliere Tindall, London. 1972.
37. MAURER, E.R., Kuttler, K.L., Yagar, R.H. and Warner, A. Immunization of Laboratory Workers with Purified Trivalent Equine Encephalomyelitis Vaccine. *Journal of immunology* 68: 109-114, 1952.
38. MCKINNEY, R.W., Berger, T.O., Sawyer, W.D., Tigertt, W.D. and Crozier, D. U Use of an Attenuated Strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus for Immunization in Man. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 12: 597-603, 1963.
39. MONLUX, W.S., Luedke, A.J., Mercado, S., Rosales, J.C., and Rios, R. Effect of Back Passage of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine (Tc-83) on the central N. S. of Horses. *J.A.V.M.A.*, Vol 161, NO.?: 832-833, October 1, 1972
40. MORRILLA-GONZALEZ, A., De Mucha Macias, J. Estudio de una Epizootia de Encefalitis Equina de Venezuela Ocurrida en Tarnaulipas, México. *Rev. Invest. Salud Pub.* Vol. XXIX, 1: 1969.
41. MUSSGAY, M., and Weibel, J. Electron Microscopic and Biological Studies on the Growth of venezuelan Equine Encephalitis Virus in KB cells. *Virology* 16: 52-62.
42. QUAN KIU DOMINGUEZ, S. Investigacion de una Epizootia de Encefalitis Equina de Venezuela Ocurrida en el Estado de Chispas, México. 1970 Tesis. Dirección de Educación en Salud Publica. Escuela de Salud Publica. 1971.
43. RALPH, R.K. Double-stranded Viral RNA. *Advances in Virus Research*. Academic Press vol. 15. 106-107, 1969.
44. RANDALL, R. and Mills, J.W. Fatal Encephalitis in man Due to the Venezuelan Virus of Equine Encephalomyelitis in Trinidad. *Science* 99: 225-226.
45. REIT.N, M. and Tonik, E.J. Immunity to Aerosol Challenge in Guinea Pig Immunized with Gamma-Irradiated Venezuelan Equine Encephalitis Vaccines. *Appl. Microbiol.* 21, No. 4, 688-92: 1971.
46. SAN MARTIN-BARBERI, C., Grant, R. and Osorno-Mesa, E. (1954). Human Epidemic in Colombia Caused by the venezuelan equine Encephalomyelitis Virus. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 3: 283-293, 1954.
47. SAN MARTIN, C., and Dueñas, A. Hemagglutination-Inhibition and Neutralization tests for the Venezuelan equine Encephalomyelitis Virus. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 8:346-48. 1959.

48. SCHERER. W.F., Dickerman, R.W., Wong Chia, C., Ventura, A., Moorhouse, A. and Geiger, R. Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in Veracruz. Mexico, and the Use of Hamsters as Sentinels. *Science* 145: 274. 1964.
49. SCHERER. W.F., Campillo-Sáenz, C., de Mucha Macías, J., Rubio Brito, R., Miura, T., Dickerman, R.W., Warner, D.W. and Dyer. M. Serologic Survey for Neutralizing Antibodies to Eastern Equine Encephalitis Viruses in Man, wild Birds and swine, in Southern Mexico During 1961, *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 15: 211. 1966.
50. SCHERER, W.F., and Pancake, W.F. Cross-Protection among Viruses of the Venezuelan Equine Encephalitis Complex in Hamsters. *Am. J. Epidem.* Vol. 91, No. 2: 1970.
51. SCHERER, W.F., Ordonez, J.V., Jahrling. P.B., Pancake, B.A. •• and Dickerman, R.W. Observations of Equines, Humans and Domestic and Wild Vertebrates During the 1969 Equine Epizootic and Epidemic of Venezuelan Encephalitis in Guatemala. *Am. J. Epidem.* vol. 95. No. 3. ~55-266, 1972.
52. SIDWEL, R.W., Gephardt, L.P., and Thorpe, B.D. Epidemiological Aspects of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infections. *Bacteriol. Rev.* 31, No.1: 65-81, 1967.
53. SMITH, D., Mamay, H., Marshall, R., and Wagner, J., 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.
54. SOTOMAYER, C.G. A Study of the Virus of Equine Encephalomyelitis in Ecuador. *J.A.V.M.A.* 109: 478-480, 1946.
55. SPERTZEL, R.O., and Kahn, D.E. Safety and Efficacy of an Attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine for Use in Equidae. *J.A.V.M.A.* 159: 731-738, Sept 15, 1971.
56. STAAB. E.V., Normann, S.J., Craig, C.P. Alterations in Reticuloendothelial Function by Infection with Attenuated Venezuelan Equine Encephalitis (EEV) Virus. *RES Journal of Reticuloendothelial Society* 8: 342-348, 1970
57. SUDIA, W.D., and Chamberlain, R.W. Battery-Operated Light Trap. an improved Model. *Mosq. News.*, 22: 126-29, 1962.
58. TABER, L.E., Hogge, A.L., and McKinney, R.W. Experimental Infection of Dogs with Two Strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. *Am. J. of Trop. Med. and Hyg.* 14: 647-651, 1965.
59. TAVIZON, G.G. y Fragoso, U.R. Informe Final en Relación a la Encefalitis Equina de Venezuela en el Estado de Zacatecas Durante el Año de 1972. Servicios Coordinados de Salud Pública en el Estado. Departamento Técnico. Sub jefatura de Programas Preventivos. Sección de Zoonosis: 1972.
60. TAYLOR, W.M. and Buff, E. Transmissibility of an Attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine Virus. *J.A.V.M.A.*, Vol. 161, No. 2: 159-163, July 15, 1972.

61. TIGERTT, W.D., and Downs, W.G. Studies on the Virus of Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Trinidad, the 1943-1944 Epidemic Am. J. Trop. Med. and Hyg. 11: 822-834 1962.
62. WALTON, T.E., Brautigam, F.E., Ferrer, J.A. and Johnson, K.M. Epizootic Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Central America. Diseases Patterns and Vaccine Evaluation in Nicaragua, 1969-1970. Am. J. of Epidem. vol. 95. No. 3: 1972.
63. WALTON, T.E. and Johnson, K.M. Persistence of Neutralizing Antibody in Equidae Vaccinated with Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine Strain TC/83. J.A.V.M.A. vol. 161, No. 8: 916-918. October 15, 1972.
64. WONG-CHIA, C, and Scherer, W.F., Aislamiento del Virus de la Encefalitis Venezolana de un Murcielago Fructivoro (*Artibeus turpis*) en México. Bol. Of. Sanit. Panam. 70: 339-343, 1971.
65. WORK, T.R. serological Evidence of Arbovirus Infection in The Seminole Indians of southern Florida. Science 145: 270-272, 1964
66. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser. 369 1967.
67. YOUNG, N.A. and Johnson, K.M. Viruses of the Venezuelan Equine Encephalomyelitis Complex. Infection and Cross Challenges of Rodents with VEE, Mucambo, and Pixuna Viruses. Am. J. Trop. Med. and Hyg. Vol. 18, No. 2. 1969.
68. YOUNG, N.A., Johnson, K.M. Antigenic Variants of Venezuelan Equine Encephalitis Virus: Their Geographic Distribution and Epidemiologic Significance. Am. J. Epidemiol. 89: 286-307, 1969.
69. ZARATE, M.L., and Scherer, W.F. Contact-Spread of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus Among cotton Rata via Urine or Feces and the Naso or Oropharynx. A Possible Transmmission cycle in Nature. Am. J. Trop. Med & Hyg. 17, No. 6; 894-899. 1968.
70. ZHDANOV, V.M., Ershova, F.I. Inhibition of Reproduction of Venezuela Equine Encephalomyelitis Virus with Puromysin (Rus. Eng. Abstract) Antibiotiki 10, No. 3, 255-259, Moscow, USSR: 1965.