

LE
41
T 30
P393
1972

ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS DE LA ENCEFALOMIELITIS EQUINA
VENEZOLANA EN ASNOS

Plantas

TESIS

Presentada al Programa de Estudios para Graduados en Ciencias
Agrarias Universidad Nacional-Instituto Colombiano
Agropecuario (ICA)

Por

JAIME PAYAN MORENO

como requisito parcial para optar el grado de

MAGISTER SCIENTIAE

1.972

BOGOTA, COLOMBIA

TESIS APROBADA POR:

COMITE CONSEJERO:

Presidente:

L. G. Adams

L. G. ADAMS, D.V.M., Ph.D.

Miembro:

R. B. MACKENZIE, M. D.

Miembro:

Otto Sanchez F.
OTTO SANCHEZ F., D.V.M., M.S.

El presidente de tesis y el consejo examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato. (Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional).

DEDICO ESTA TESIS

A la memoria de mi esposa Norma
y a mi pequeño hijo Jaime Fernando
A María Nelly con Amor y Gratitud.

El autor desea expresar sus sinceros agradecimientos a los Drs. Andries H. Jonkers, virólogo del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Ronald B. Mackenzie, médico epidemiólogo de la Fundación Rockefeller por su amplia colaboración a lo largo del presente estudio; a los Drs. L. G. Adams, E. D. Roberts y Otto Sánchez por sus orientaciones a lo largo de los estudios de Post-Grado.

Agradezco al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y a la Universidad Nacional de Colombia su colaboración en la culminación de los estudios de Post-Grado.

Mi agradecimientos sinceros a la señorita Myriam L. Tórres y al señor Héctor Gómez J., bacterióloga y auxiliar de la Sección de Arbovirus respectivamente, por su eficiente y desinteresada colaboración a lo largo del presente estudio.

Al Dr. Normando Arbeláez mis sentimientos de gratitud por sus ideas en el presente estudio; a todas y cada una de las personas que en una u otra forma me alentaron a lo largo de la presente investigación en su culminación. Igualmente al personal de la Sección de Medicina Veterinaria del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Palmira.

A las señoritas Clemencia Harker y María Cristina Guzmán, mi sentimiento de gratitud y reconocimiento por su eficiente colaboración dactilográfica en el presente estudio.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
MATERIALES Y METODOS	9
Estudios Preliminares	9
Origen de la cepa	9
Preparación del lote del virus	9
Titulación del lote del virus	11
Cálculo de dosis infectiva mínima del virus	11
Estudios Finales	12
Titulación previa e inoculación de 20 RAIPDL ₅₀ ..	13
Estudios clínicos	14
Patología Clínica	14
Estudios patológicos	15
Titulación de sueros	15
RESULTADOS	18
Estudios clínicos	18
Síntomas	18
Hematología	18
Viremia en burros inoculados con 20 RAIPDL ₅₀	20
Estudios patológicos	20

	Página
Lesiones macroscópicas	20
Lesiones microscópicas	26
Adrenal	26
Amígdala	26
Bazo	27
Ganglio prescapular	28
Páncreas	29
Hígado	31
Riñón	31
Sublingual	33
Aorta	35
Corazón	35
Esófago	37
Hipófisis	37
Intestino delgado y grueso	37
Labio, lengua, músculo semitendinoso, ovario, pa- ladar, pene, tráquea, útero y tiroides	37
Pulmón	37
Sistema Nervioso Central	38
Corteza	38
Corpus Callosi	38
Putamen	39
Puente	39
Hipocampo	41

	Página
Cerebelo	42
Medula Espinal	42
Porción Cervical	42
Porción Torácica	44
Porción Lumbar	44
Porción Sacra	44
Grupo Central	44
DISCUSION	49
Observaciones Clínicas	49
Patología Clínica	49
Hematología	49
Observaciones Post-Mortem	51
Patología Macroscópica	51
Patología Microscópica	52
Sistema Nervioso Central (SNC)	55
RESUMEN	61
BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Trabajo realizado en 16 asnos inoculados experimentalmente con virus de EEV 20 RAIPDL ₅₀ vía subcutánea	17
2. Comportamiento clínico observado en 16 asnos inoculados con virus de EEV	19
3. Viremia en asnos inoculados con virus de encefalomiелitis equina Venezolana vía subcutánea ...	25
4. Hallazgos microscópicos en varios órganos de 16 asnos inoculados experimentalmente con virus de encefalomiелitis equina Venezolana	45
5. Hallazgos microscópicos en sistema nervioso central de 16 asnos inoculados experimentalmente con virus de encefalomiелitis equina Venezolana	46
6. Incidencia de lesiones por regiones anatómicas en el sistema nervioso central encontrados en 16 asnos inoculados con virus de EEV	47
7. Incidencia de lesiones por regiones anatómicas en la médula espinal encontrados en 16 asnos inoculados con virus de EEV	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Valores promedios de glóbulos blancos encontrados en asnos inoculados con virus de EEV con 95% de intervalo de confiabilidad	21
2. Valores promedios de recuentos diferenciales de glóbulos blancos encontrados en asnos inoculados con virus de EEV	22
3. Valores promedios de hematocritos encontrados en asnos inoculados con virus de EEV con 95% de intervalo de confiabilidad	23
4. Valores promedios de hemoglobina encontrados en asnos inoculados con virus de EEV con 95% de intervalo de confiabilidad	24
5. Amígdala de asno No. 8, día 4 PI. Necrosis de células linfáticas con restos nucleares. HE 450 X	30
6. Ganglio linfático prescapular de asno No. 11, día 6, PI. vasculitis necrótica con hiperplasia de células endoteliales. HE 900 X	30
7. Páncreas de asno No. 12, día 6, PI. Necrosis pancreática enzimática con disociación de la arquitectura. HR 450 X 31	32

8. Hígado de asno No. 5, día 3, PI. Metamorfosis grasa en los hepatocitos en zona paracentral. HE 900 X	32
9. Hígado de asno No. 15, día 8, PI. Necrosis fo- cal hepática de coagulación. HE 900 X	34
10. Riñón de asno No. 7, día 4, PI. Necrosis de coagulación extensa de túbulos renales de zona cortical. HE 900 X	34
11. Glándula sublingual de asno No. 9, día, PI. Desorganización de la arquitectura con dege- neración hidrópica (1) y parenquimatosa (2), HE 450 X	36
12. Glándula sublingual de asno No. 9, día 5, PI. Trabécula conjuntiva infiltrada por células polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos	36
13. Corteza cerebral de asno No. 16, día 8, PI. Infiltración mixta de neutrófilos y linfoci- tos con necrosis neuronal (flechas). HE 450 X ..	40
14. Corteza cerebral de asno No. 13, día 7, PI. Foco de gliosis de tipo microglia. Tricró- mica de Masson. 450 X	40
15. Corteza cerebral de asno No. 16, día 8, PI. Necrosis extensa de neuronas (flechas). Tri- crómica de Masson. 450 X	43

16. Cerebelo de asno No. 16, día 8, PI. Necrosis
focal en capa molecular, comprometiendo las
células de Purkinje. HE 450 X 43

INTRODUCCION

La encefalomiелitis equina venezolana (EEV) es por hoy la enfermedad viral más difundida últimamente entre los países de Centroamérica, Suramérica y ahora en Norteamérica, igualmente por ser una zoonosis en que esta comprometida la salud del hombre, viene siendo motivo de preocupación por las autoridades sanitarias y de investigación especiales que tratan de controlar la expansión de esta virosis. En Colombia (52, 55, 61), las epidemias sucedidas han diezmado la población equina, limitando el crecimiento de esta especie utilizada en labores de campo y transporte.

Los estudios epidemiológicos están encauzados a esclarecer el misterio de cómo ésta virosis se mantiene en la naturaleza, y el reservorio natural a partir del cual la infección es ampliada por los vectores. La revisión de la literatura demuestra como la encefalomiелitis equina venezolana ha sido motivo de estudios múltiples en varios aspectos.

Los estudios histopatológicos realizados por varios autores utilizando varios patrones entre ellos: ratones, curies, conejos y monos describen cambios progresivos de la enfermedad. En huéspedes específicos como equinos y asnos se describen cambios histopatológicos utilizando varias do-

sis y vías de inoculación, pero no siguen las secuencias de la enfermedad, síntomas clínicos y lesiones histopatológicas.

De los trabajos realizados sobre sistema nervioso (52), describen los cambios neuropatológicos sucedidos en un brote natural de EEV, no conociéndose los datos acerca del tiempo transcurrido, desde la infección hasta la muerte ni la evolución de los síntomas clínicos.

Los puntos antes mencionados, llevaron a iniciar el presente estudio, orientando a los estudios histopatológicos de la encefalomyelitis equina venezolana en asnos (Equus asinus), utilizando una cepa aislada en la Costa Norte de Colombia. El experimento fue realizado en el laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV), dependencia del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), y tuvo duración de 8 días.

REVISION DE LITERATURA

La encefalomiелitis equina venezolana (EEV) es una enfermedad viral transmitida por artrópodos (18, 26) con presentación enzoótica y epizootica en ciertas áreas de América Central, América del Sur y Norte América, como la presentada en la Guajira Venezolana en 1936 y 1938. La presentación de la enfermedad, coincide con las precipitaciones pluviales que inundan grandes áreas donde proliferan los vectores que amplian la enfermedad.

En 1938, Wladimir Kubes y Francisco Ríos (33) aislaron e identificaron el agente causal de la enfermedad, desde entonces el virus es conocido como "tipo venezolano" en honor del país donde se identificó por primera vez. Posteriormente, el virus ha sido reportado en Venezuela (1, 35, 57), Estados Unidos (15, 30, 67), Mexico (22, 45, 46, 47, 56), Guatemala (36), Panamá (21, 25, 42, 50), Colombia (26, 52, 55, 61), Curacao (16), Trinidad (3, 17, 23, 34, 64), Ecuador (2, 14, 40, 60), Brazil (6, 11, 12) y Argentina (4, 66).

El virus de la encefalomiелitis equina venezolana ha sido clasificado inmunológicamente como perteneciente al grupo A entre los arbovirus (10), donde están incluidos los virus de la encefalomiелitis del Este (EEE) y Oeste (WEE), igualmente los virus que se consideran variantes de EEV co-

mo son Mucambo y Pixuna (58), y otros de menor importancia.

El virus de la EEV se caracteriza por ser pequeño, estudios al microscópio electrónico han demostrado que su diámetro es de 40-45 milimicras (48, 49). En células infectadas con virus de EEV se han observado vacuolas citoplasmáticas con partículas virales, las cuales pasan al lúmen a través de la membrana de las vacuolas. Partículas virales suspendidas en sulfato de protamina han sido descritas con diámetro de 65-80 milimicras. Bykosky et al. (7) estudiando la morfogenesis del virus de EEV, han revelado estructuras específicas de los viriones, las cuales fueron vistas en estados iniciales de la infección en células de cultivo; estas estructuras estaban compuestas de ácido ribonucleico (ARN) viral de forma cilíndrica o fibrilar. Estudios de la arquitectura del virus, revelan una estructura esférica del núcleo de 30-40 milimicras (30).

Análisis de preparaciones virales purificadas por método de centrifugación de densidad de gradiente de sucrosa, han demostrado que el contenido de lípidos en el virus es de 24.3%, porcentaje esencial en el mantenimiento de la infectividad del virus (68). El material genético del virus de la encefalomiелitis equina venezolana es ARN el cual constituye el 6.2% del peso total virus. El virus de la EEV puede ser preservado mediante la liofilización, o en

50% de glicerina amortiguada a -70°C (62).

Clínicamente la enfermedad se presenta en el hombre en forma subclínica, caracterizandose por fiebre, cefalea y a veces vómitos (8, 9, 32, 54, 59). En los equinos la enfermedad se presenta con fiebre alta, posteriormente se observan síntomas de decaimiento y en la fase final síntomas clásicos de encefalomiелitis. Los cambios hematológicos coinciden con una marcada leucopenia, siendo las células más afectadas los linfocitos (24, 31), igualmente los valores del hematocrito y la hemoglobina están alterados en la infección.

El virus de la EEV puede ser recobrado de la sangre en fases iniciales de la infección (31), igualmente de lavados faringeos especialmente en el hombre y animales pequeños; también puede ser aislado el virus a partir de varios órganos (63). El animal elegido para el aislamiento es el ratón lactante (15, 17), igualmente el hamster ha sido utilizado por su susceptibilidad (56).

Para la identificación del virus se han utilizado las pruebas de rutina en arbovirus como son: (i) suero neutralización (SN), (ii) fijación del complemento (FC) (iii) inhibición de la hemaglutinación (IH) (27). La técnica de anticuerpos fluorescentes (A/F) ha demostrado ser útil en es-

tudios de la patogenesis (38).

El efecto del virus de la EEV ha sido demostrado (24, 31). Estudios histopatológicos en varios órganos de asnos inoculados con el virus de EEV describen focos de necrosis en la corteza adrenal con hemorragia y cambios vasculares (24). Contrario a estos hallazgos Kissling et al. (31) no reportaron cambios en esta glándula, en estudios de la patología de EEV en caballos. En bazo, focos de necrosis con destrucción de linfocitos e infiltración neutrofílica han sido reportados (24). Kissling et al. (31) reportaron como único cambio en este órgano depoblación de elementos linfoides y pérdida de la arquitectura.

Victor, J. et al. (65) en estudios comparativos de la patología de EEV utilizando varios patrones, encontraron necrosis masiva de ganglios linfáticos, depoblación de células linfáticas y marcada infiltración neutrofílica. Gleiser et al. (24) reportaron en ganglios linfáticos de burros hiperplasia linfoidea, con necrosis focal múltiple e infiltración neutrofílica. Kissling et al. (31) describieron cambios hemorrágicos en este órgano.

Referente al páncreas lesiones de necrosis múltiple sin estar comprometidos los islotes de Langerhans han sido descritos (31). Gleiser et al. (24) no observó cambios sig-

nificativos en este órgano en burros inoculados con virus de EEV. En hígado cambios de degeneración albuminosa y focos de hematopoyesis en el parenquima hepático en caballos infectados con virus de EEV han sido reportados (31). Gleiser et al. (24) estudiando este órgano hallaron necrosis hepática con varios grados de infiltración celular, primariamente neutrofílica y posteriormente linfocitaria.

En el riñón, se han reportado cambios de degeneración albuminosa en tubulos renales con material fibrinoso en el lúmen, igualmente necrosis en los tubulos contorneados proximales de un caballo infectado por picadura de mosquitos (31).

En glándula sublingual no se reportan cambios, igualmente en corazón, pulmón, amígdala, intestino, estómago, testículos, músculo y pituitaria (31).

Victor (65) encontró, en varios animales de laboratorio, lesiones cerebrales consistentes en infiltración perivascular, necrosis neuronal y fagocitosis de células necróticas. Kissling et al (31) estudiando la patología de EEV en caballos describió como cambios más significativos de la enfermedad, edema perivascular, hiperplasia de células endoteliales, hemorragias, infiltración linfocitaria perivascular y pérdidas de la sustancia de Nissl. Gleiser

et al (24) reconoció en asnos meningoencefalitis con necrosis franca de neuronas e infiltración neutrofílica, pérdida de la arquitectura normal, vacuolización y destrucción neuronal fueron los cambios más significativos. Las lesiones más acentuadas fueron en el tálamo y cerebro medio y menos severas en corteza.

Estudios neuropatológicos realizados por Roberts et al. (52) de un brote natural de EEV acaecido en Colombia describieron cambios similares a los descritos en los trabajos anteriores como: necrosis vascular, gliosis, infiltración perivascular linfocitaria y mixta de linfocitos y neutrófilos con necrosis neuronal. Los cambios más significativos fueron en corteza y cerebro medio. En cuanto a cambios en la medula espinal la literatura no menciona lesiones en esta porción del sistema nervioso.

MATERIALES Y METODOS

ESTUDIOS PRELIMINARES:

Origen de la cepa. La cepa utilizada en el presente estudio procedía de un aislamiento efectuado por el Dr. R. B. Mackenzie del suero de un equino atacado de EEV del brote acaecido en 1967 y 1968 en el departamento de Córdoba, Colombia. La cepa se identificó como Bo An* (20-23-24) en el archivo de la Sección de Arbovirus del LIMV dependencia del ICA. La cepa resultó ser típica de este brote y no fue distinta de otras cepas halladas en brotes epidémicos en Colombia y Panamá**.

Ratones blancos adultos se utilizaron en las pruebas de titulación y neutralización, todos provenían de la colonia del LIMV.

Preparación del lote del virus. Del lote de virus identificado con el No. 203257 de la Sección de Arbovirus del LIMV, conservado a -90°C y teniendo un tercer pasaje por cerebro de ratón lactante. Un vial se descongeló y se preparó una dilución 10^2 en salina amortiguada de fosfatos más 0.075% de albúmina bovina, penicilina y estreptomina.

* Bogotá Animal

** R. B. Mackenzie, 1971. Comunicación personal.

Cinco familias con ocho ratoncitos fueron inoculados con 0.025 ml. vía intracerebral. Los ratones fueron recolectados en estado moribundo en número de treinta, seguidamente fueron sangrados y recolectados los cerebros en cajas de Petri congelándose inmediatamente en nieve carbónica a -70°C y almacenados finalmente a -90°C hasta su utilización.

Se procedió a liofilizar* el lote de virus utilizando para ello suero fetal bovino en proporción del 20% como estabilizador, más 80% de salina amortiguada de fosfatos con penicilina y estreptomina.

Los cerebros fueron pesados y molidos en un homogenizador de 40 ml, transferido el material a tubos Corex de 15 ml y centrifugados** a 10.000 revoluciones por 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para envasar un total de 28 ampolletas de 2 ml de capacidad con 0.5 ml de suspensión viral, congelándose inmediatamente cada una de ellas en mezcla de metanol y nieve carbónica. Una vez envasadas todas

* Virtis Freeze Mobile, Model 1D-140-BA, Gardiner. New York.

** Sorval Super Speed RC2-B, tipo SS-34, Centrifuge, Ivan Sorval INC, Connecticut U.S.A.

ellas se las protegió con algodón estéril y se almacenaron a -90°C hasta el día de su liofilización.

Un liofilizador Virtis se utilizó en el proceso colocándose cada ampollita con un intervalo de un minuto cada ampollita, selladas al vacío e identificadas con el número 212967.

Titulación del lote del virus. Cuatro ampollitas escogidas al azar fueron utilizadas para conocer el título del lote liofilizado. Ratones adultos inoculados por vía intraperitoneal con 0.2 ml de las diluciones 10^2 a 10^{11} y determinado el título (51), el cual fue de $10^{9.8}/0.2$ ml.

Cálculo de dosis infectiva mínima del virus. Tres asnos fueron escogidos al azar para calcular la dosis mínima infectiva. Se ensayaron 2 RAIPDL₅₀*, 10 RAIPDL₅₀ y 20 RAIPDL₅₀ idenpendientemente cada una de ellas.

En cada ensayo se tomaron ampollitas al azar reconstituyéndose con 0.5 de agua destilada estéril cada una, su contenido mezclado y transferido a dos viales que eran congelados simultáneamente a -90°C . Una porción era descongelada al tercer día para titulación en ratón adulto. Al tér-

* Ratón adulto intraperitoneal dosis letal.

mino de esta y conocido el título se descongelaba la otra porción y se inoculaban los asnos teniendo la precaución de titular nuevamente. La razón para hacer esto era de que usando este método se tenía la seguridad de inocular siempre las dosis deseadas sin correr el riesgo de que el inóculo tuviera un título diferente**.

El comportamiento con estas dosis fueron las siguientes: los asnos inoculados con 2 RAIPDL₅₀ y 10 RAIPDL₅₀ no presentaron síntomas clínicos de la enfermedad. El asno que recibió 20 RAIPDL₅₀ presentó síntomas clínicos de la enfermedad considerándose que esta dosis era la ideal para el estudio.

ESTUDIOS FINALES:

Ventiún asnos colombianos (Equus asinus) fueron utilizados para el estudio de la patología de EEV. Todos procedían de la Sabana de Bogotá, su edad oscilaba entre 3 y 6 años y estaban destinados a labores domésticas. Anticuerpos para EEV no fueron detectados por la prueba de sueroneutralización. Exámenes previos de hematología revelaron anemia en muchos de ellos y presencia de parásitos de los géneros Trichostrongylus y Trichonema. Los animales se identifica-

** Jonkers, A. H. 1970. Comunicación personal.

ron en 8 grupos del No. 1 al No. 16 y los controles C-1 y C-2.

Titulación previa e inoculación de 20 RAIPDL₅₀

Del lote de ampollitas liofilizadas e identificadas con el número 212967 conservadas a -90°C se tomaron cuatro ampollitas que fueron reconstituidas cada una de ellas con 0.5 ml de agua destilada estéril. En dos viales estériles fue dividida la suspensión viral (1.2 ml) obtenida de las cuatro ampollitas. Una cantidad (0.6 ml) fue envasada y congelada simultáneamente a -90°C .

Una porción fue descongelada al tercer día para hacer titulación previa en ratones adultos. Al término de la titulación el título obtenido fue de $10^{9.8}/0.2$ ml. vía intraperitoneal. Conocido el título se procedió a la inoculación simultánea de 20 RAIPDL₅₀ a 21 asnos vía subcutánea con base en los estudios preliminares.

Diluciones desde 10^2 a 10^{11} en salina amortiguada de fosfatos, más 0.75% de albúmina bovina, más Penicilina y Streptomycin fueron hechas adicionándose 0.2 ml de suspensión viral proveniente del segundo vial conservado a -90°C al tubo marcado dilución 10^2 . A partir de este se hicieron diluciones de 1 en 10. Como el título inicial era de $10^{9.8}$ se procedió a calcular el (0.3) por método logarítmico para

hacer la dilución $10^{9.8}$.

Una vez obtenida la dilución $10^{9.8}$, se inocularon 4 ml de esta dilución que contenían 20 RAIPDL₅₀ en la región del cuello vía subcutánea a 16 asnos escogidos para el estudio.

Durante el proceso se mantuvo la suspensión viral en hielo para impedir bajas en el título, igualmente se volvió a titular en ratones adultos, obteniéndose el mismo título anterior de $10^{9.8}$.

Estudios Clínicos. Los animales fueron observados a mañana y tarde haciéndose énfasis en la aparición de los primeros síntomas de encefalitis.

Patología Clínica. Tomas simultáneas de sangre para hemograma y viremia fueron hechas. El anticoagulante usado 2 gotas de EDTA al 10% para 5 ml de sangre y para viremia se utilizaron tubos con vacío. Registros de temperatura fueron hechos a mañana y tarde. Los valores de hematocrito fueron hallados por el método de la microtecnica; la hemoglobina fue determinada utilizando el reactivo de Hycel*, usando un fotocolorímetro con filtro de 540 milimicrones.

* Hycel, Inc. Houston, Texas.

Estudios Patológicos. Dos animales eran sacrificados diariamente por el método de sangría en blanco, se recolectaron simultáneamente tejidos para titulación y estudios patológicos. Los tejidos para titulación eran colectados en frascos pequeños estériles, sellados y congelados en nieve carbónica. Los tejidos para patología eran depositados en recipiente con formalina amortiguada al 10%. Los tejidos colectados fueron: ojo, labios, lengua, paladar, mucosa nasal, sublingual, parótida, tiroides, tráquea, esófago, amígdala, ganglio preescapular, músculo semitendinoso, diafragma, pulmón, corazón, aorta, adrenal, riñón, vejiga urinaria, bazo, páncreas, estómago, intestino delgado y grueso, cerebro, cerebelo, hipófisis, medula cervical torácica, lumbar y sacra, nervio ciático, plexo braquial, útero, ovario, pene y testículo.

Secciones de 4 micras fueron coloreadas con Hematoxilina y Eosina (HE), tricrómica de Masson (TM), Sudan IV para grasa en hígado, coloración de Weigert y de ácido periódico para fibrina.

Titulación de sueros. Sangre colectada para estudios de viremia fue centrifugada* a 2.000 revoluciones por 10 minutos,

* Sorval Super Speed RC2-B, tipo SS-34, Centrifuge, Ivan Sorval INC, Connecticut U.S.A.

envasado el suero en viales, los cuales fueron congelados a -90°C . A partir de estos sueros se tomaron 0.2 ml de cada uno y se hizo diluciones de 10^2 a 10^8 inoculando ratones adultos por vía intraperitoneal con 0.2 ml de cada dilución, y calculándose el título por el método de Reed and Muench (54).

Un resumen de los trabajos realizados durante el experimento están consignados en la Tabla 1.

TABLA 1. TRABAJO REALIZADO EN 16 ASNOS
 INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE
 CON VIRUS DE EEV 20 RAIP⁺DL₅₀
 VIA SUBCUTANEA.

NUMERO DE ASNOS	HORAS	TEMPERATURA °C	HEMATOCRITO	HEMOGLOBINA	GLOBULOS BLANCOS	RECUESTO DIFERENCIAL	VIREMIA	NECROPSIA
16	12	16	16	16	16	16	16	
16	0	16	16	16	16	16	16	
16	12	16	16	16	16	16	16	
16	24	16	16	16	16	16	16	2
14	36	14	14	14	14	14	14	
14	48	14	14	14	14	14	14	2
12	60	12	12	12	12	12	12	
12	72	12	12	12	12	12	12	2
10	84	10	10	10	10	10	10	
10	96	10	10	10	10	10	10	2
8	108	8	8	8	8	8	8	
8	120	8	8	8	8	8	8	2
6	132	6	6	6	6	6	6	
6	144	6	6	6	6	6	6	2
4	156	4	4	4	4	4	4	
4	168	4	4	4	4	4	4	2
2	180	2	2	2	2	2	2	
2	192	2	2	2	2	2	2	2

*RATON ADULTO INTRAPERITONEAL DL₅₀

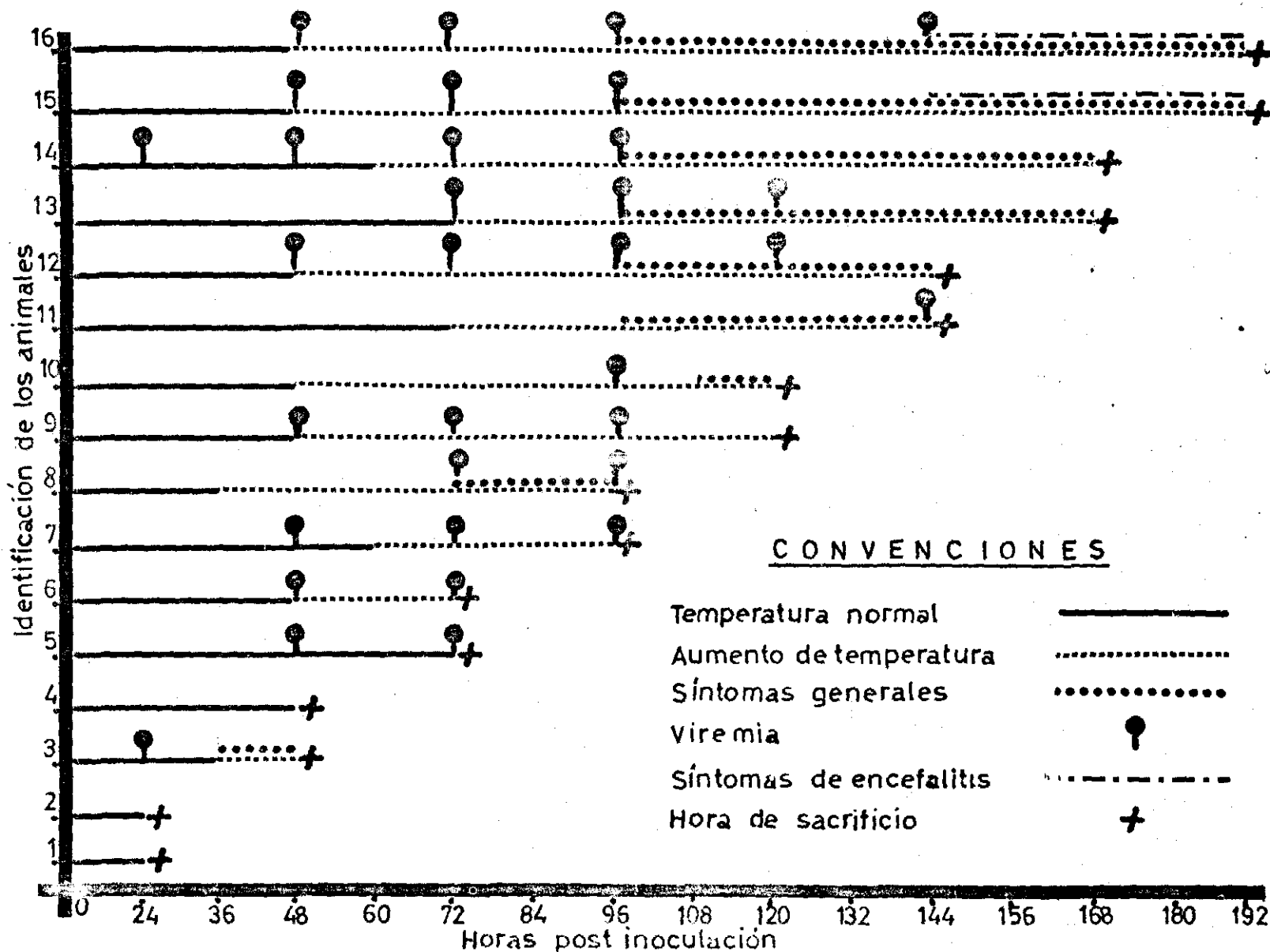
RESULTADOS

ESTUDIOS CLINICOS:

Síntomas: Burros inoculados con 20 RAIPDL₅₀ del virus de EEV, presentaron reacción febril la cual osciló entre 39.1°C y 40.5°C. Síntomas generales de la infección fueron observados inicialmente como: temblores en un asno del grupo 3 a la hora 36, depresión y síntomas encefalíticos fueron reconocidos en 2 animales del grupo 8 con movimientos de quijada, decúbito lateral con excitación y movimientos de remos a partir de la hora 144. Resumen de los síntomas clínicos, elevación de la temperatura y viremia están consignados en la Tabla 2.

Hematología: Los animales inoculados experimentalmente presentaron una marcada linfopenia absoluta a partir de la hora 48, igualmente una neutropenia relativa fue observada en la hora 84. Los eosinófilos decrecieron progresivamente y desaparecieron totalmente a partir de la hora 96. De igual manera los valores promedios de hemoglobina y hematocrito decrecieron a partir de la hora 48 y se acentuaron en la hora 84. Los valores promedios de globulos blancos, recuento diferencial, hematocrito y hemoglobina están determinados an las Figuras 1, 2, 3 y 4.

Tabla 2 Comportamiento clínico observado en 16 asnos inoculados con virus de E.E.V.



Los cambios hematológicos más significativos se presentaron en la hora 84 coincidiendo con una leucopenia absoluta de leucocitos totales, hematocrito y hemoglobina. Estos hallazgos coinciden con los primeros síntomas clínicos de la infección.

Viremia en burros inoculados con 20 RAIPDL₅₀: Los títulos encontrados en los sueros colectados cada 24 horas están consignados en la Tabla 3.

ESTUDIOS PATOLOGICOS:

Lesiones Macroscópicas: Los animales No. 15 y 16 del grupo 8 presentaron una congestión cerebral, ningún otro cambio significativo de la infección fue observado en el resto de animales.

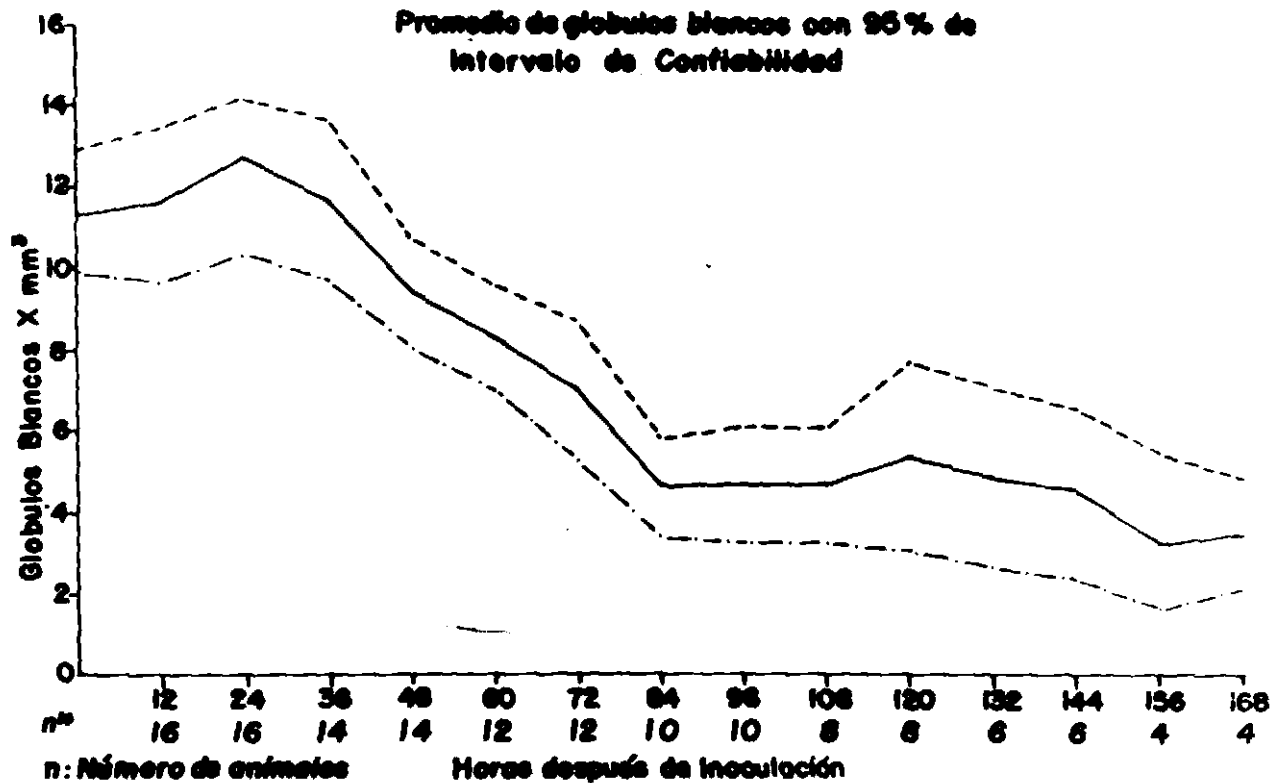


Figura 1. Valores promedios de leucocitos totales, encontrados en asnos inoculados con virus de EEV con 95% de intervalo de confiabilidad.

Valores promedios de recuento de globulos blancos

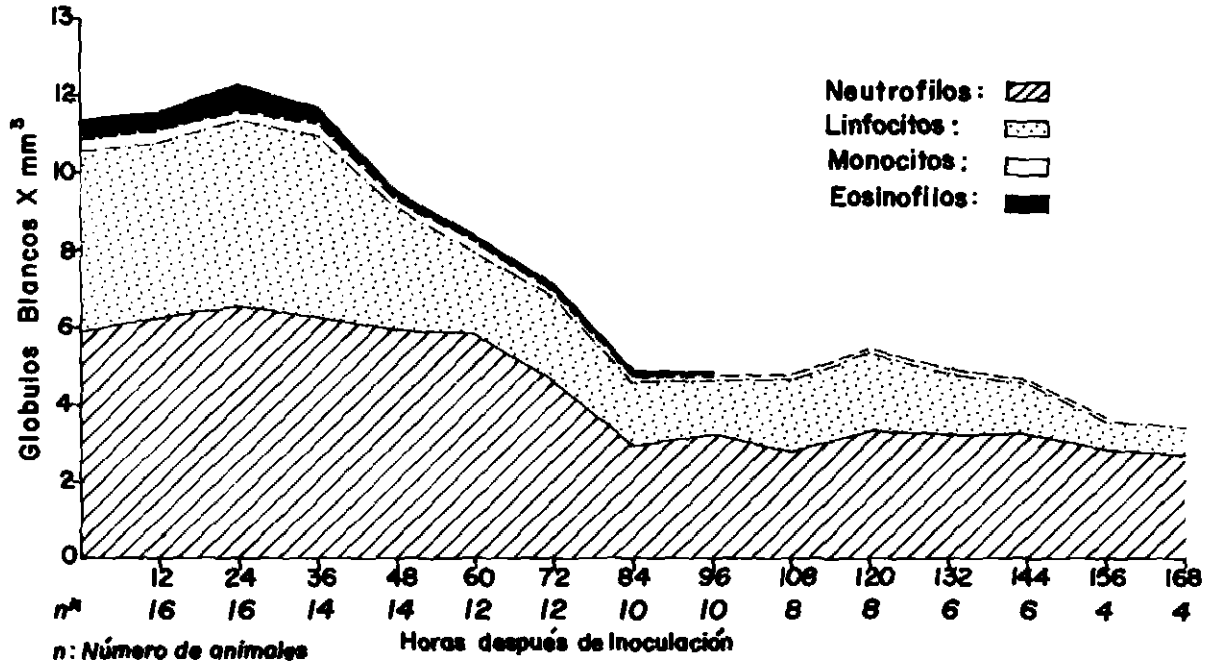


Figura 2. Valores promedios de recuentos diferenciales de leucocitos encontrados en asnos inoculados con virus de EEV.

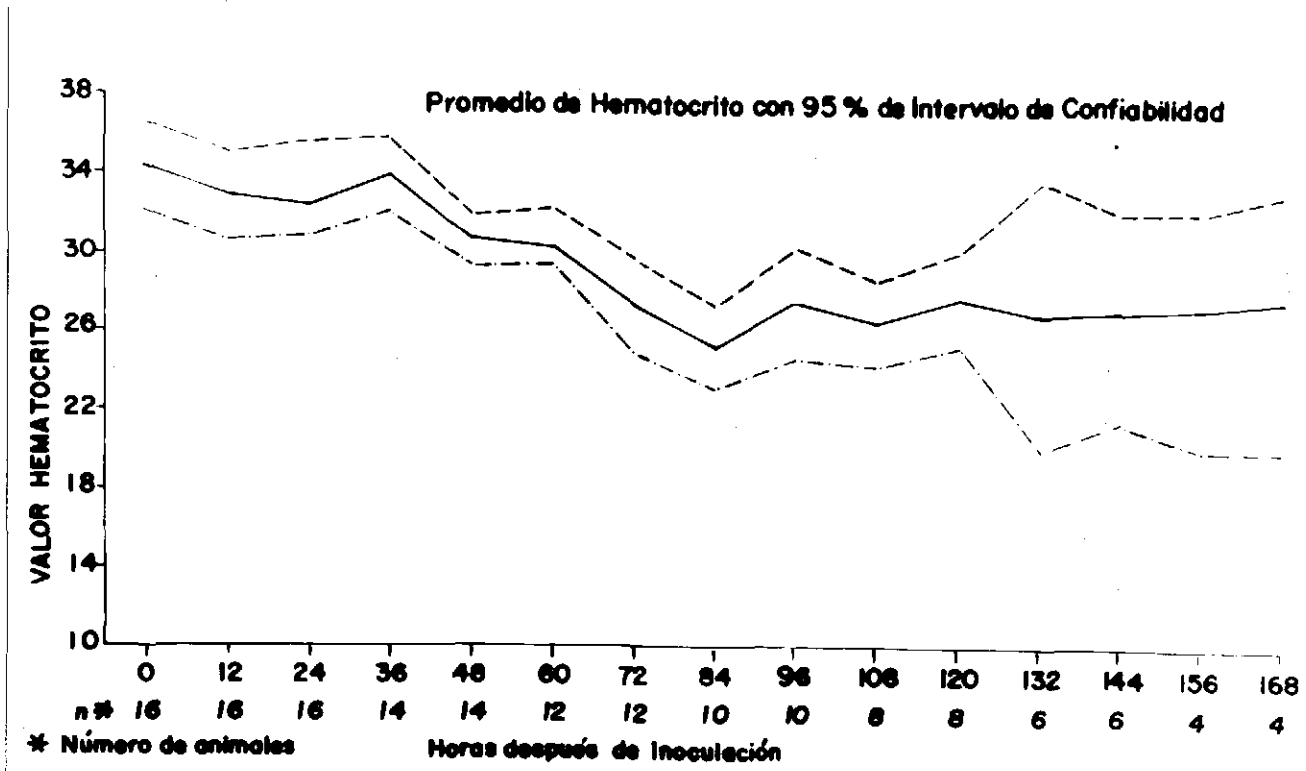


Figura 3. Valores promedios de hematocritos encontrados en asnos inoculados con virus de EEV con 95% de intervalo de confiabilidad.

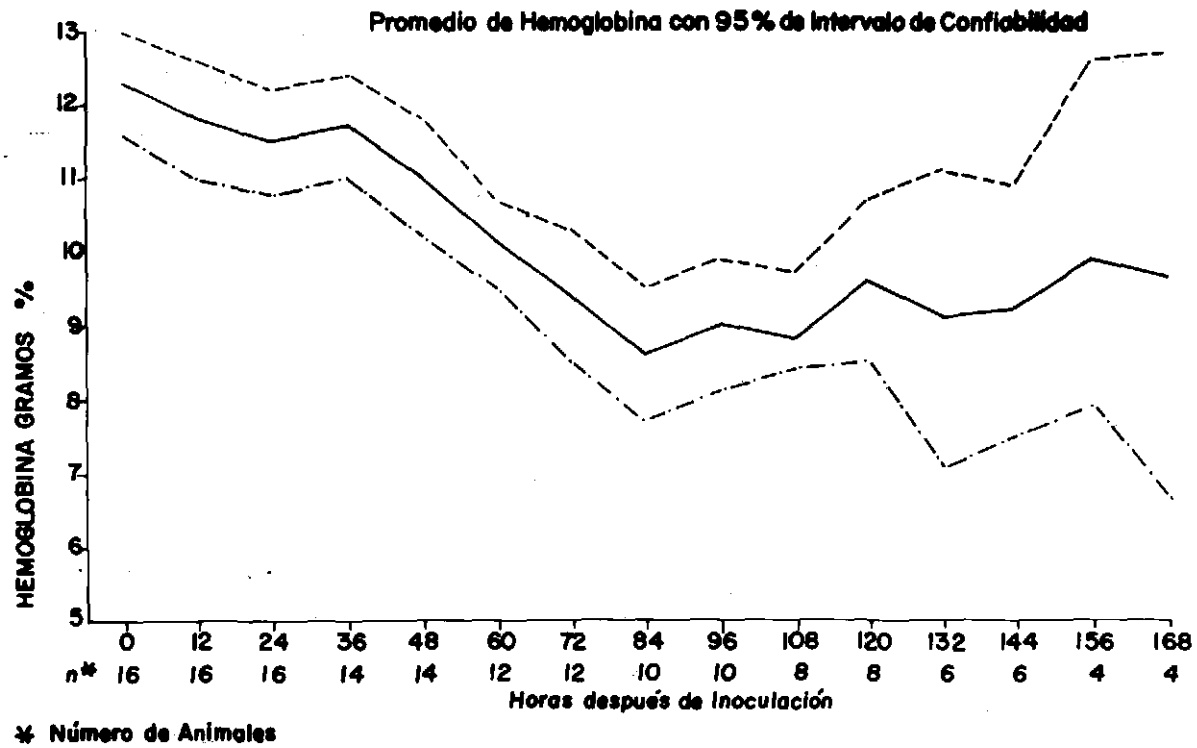


Figura 4. Valores promedios de hemoglobina encontrados en asnos inoculados con virus de EEV con 95% de intervalo de confiabilidad.

TABLA 3. VIREMIA EN ASNOS INOCULADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALOMIELITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV) VIA SUBCUTANEA 20 RAIPDL₅₀

BURRO NO.	HORAS DESPUES DE INOCULACION (LOG. DL50 TITULO DE VIRUS EN SUEROS)								
	24	48	72	96	120	144	168	192	
1	-*								
2	-								
3	1.5	4.32							
4	-	1.16							
5	-	2.49	1.83						
6	-	3.22	4.16						
7	-	4.39	5.5	7.1					
8	-	3.65	5.4	6.3					
9	-	4.3	7.0	7.0	**				
10	-	-	-	1.8	-				
11	-	-	2.62	3.8	5.1	1.5			
12	-	3.24	3.39	3.37	1.45	-			
13	-	-	-	3.62	3.37	-	**		
14	1.48	3.5	3.74	4.34	-	-	-		
15	-	1.5	-	-	-	-	-		
16	-	4.0	5.0	5.1	2.36	-	-		

* NO HUBO VIREMIA.

** NO SE TRABAJO POR DETERIORO DE LA MUESTRA.

LOS TITULOS ENCONTRADOS ESTAN CONSIGNADOS HASTA LA HORA DE SACRIFICIO DE CADA ANIMAL.

Lesiones Microscópicas:Adrenal.

- Hora 24 Histológicamente normal.
- Hora 48 Degeneración hidrópica de células de la zona fascicular con individualización celular. Focos de infiltración linfocitaria en la cápsula y zona fascicular.
- Hora 72, 96, 120, 144, 168 Degeneración hidrópica de células de la zona fascicular y glomerular; en la hora 168 también se encontró hiperplasia de células de la zona glomerular y necrosis focal de coagulación en la zona fascicular.
- Hora 192 Degeneración hidrópica de células de la zona fascicular y necrosis focal de coagulación en células inflamatorias.

Grupo Histológicamente normal.
Control

Amígdala.

- Hora 24 Histológicamente normal.
- Hora 48, 72 Infiltración difusa de polimorfonucleares neutrófilos y necrosis de células linfáticas con restos nucleares en centros germinales de folículos

linfáticos.

- Hora 96 Necrosis marcada de células linfáticas en centros germinales de los folículos linfáticos con presencia de fibrina y restos celulares (Figura 5).
- Hora 120 Presencia de fibrina en centros germinales de los folículos linfáticos y necrosis de células linfáticas con restos celulares.
- Hora 144 Depoblación de células linfáticas en centros germinales de folículos linfáticos por necrosis marcada de estas células, con material fibrinoso y restos celulares.
- Hora 168 Infiltración difusa de polimorfonucleares neutrófilos y necrosis de células linfáticas con restos celulares.
- Hora 192 Depoblación de células linfáticas, presencia de fibrina en centros germinales de los folículos linfáticos.
- Grupo Histológicamente normal.
Control
- Bazo.
- Hora 24 Histológicamente normal.

Hora 72, Presencia de fibrina en corpusculos de Malpighi.
 96, 120,
 144, 168.
 Grupo Abundante hemosiderina. Histológicamente normal.
 Control

Ganglio Prescapular.

Hora 24 Histológicamente normal.
 Hora 48 Hemorragia subcapsular, infiltración focal de polimorfonucleares neutrófilos, presencia de fibrina y necrosis celular moderada.
 Hora 72 Infiltración eosinofílica difusa, hemorragia subcapsular, presencia de fibrina alrededor de trabéculas conjuntivas.
 Hora 96 Presencia de fibrina en centros germinales, infiltración difusa de polimorfonucleares neutrófilos, presencia de macrófagos y células plasmáticas, necrosis celular extensa con restos celulares.
 Hora 120 Hiperemia vascular deposición de fibrina en el estroma ganglionar, presencia de macrófagos y necrosis celular focal.
 Hora 144 Infiltración neutrofílica marcada, presencia de fibrina en el estroma ganglionar, vasculitis ne-

crótica con hiperplasia (Figura 8).

Hora 168, Hemorragia subcapsular alrededor de trabécula,
192. vasculitis necrótica de vasos trabeculares con
hiperplasia de células endoteliales, infiltra-
ción neutrofílica y eosinofílica en el estroma
ganglionar y necrosis celular focal.

Grupo

Histológicamente normal.

Control

Páncreas.

Hora 24 Histológicamente normal.

Hora 48 Desorganización de la arquitectura.

Hora 72 Desorganización de la arquitectura, pérdida de
citoplasma.

Hora 96 Desorganización de la arquitectura.

Hora 120 Desorganización de la arquitectura.

Hora 144 Desorganización de la arquitectura, picnosis nu-
clear, necrosis focal con lisis citoplasmática
(Figura 9).

Hora 168, Desorganización de la arquitectura, pérdida de
192. citoplasma.

Grupo

Histológicamente normal.

Control

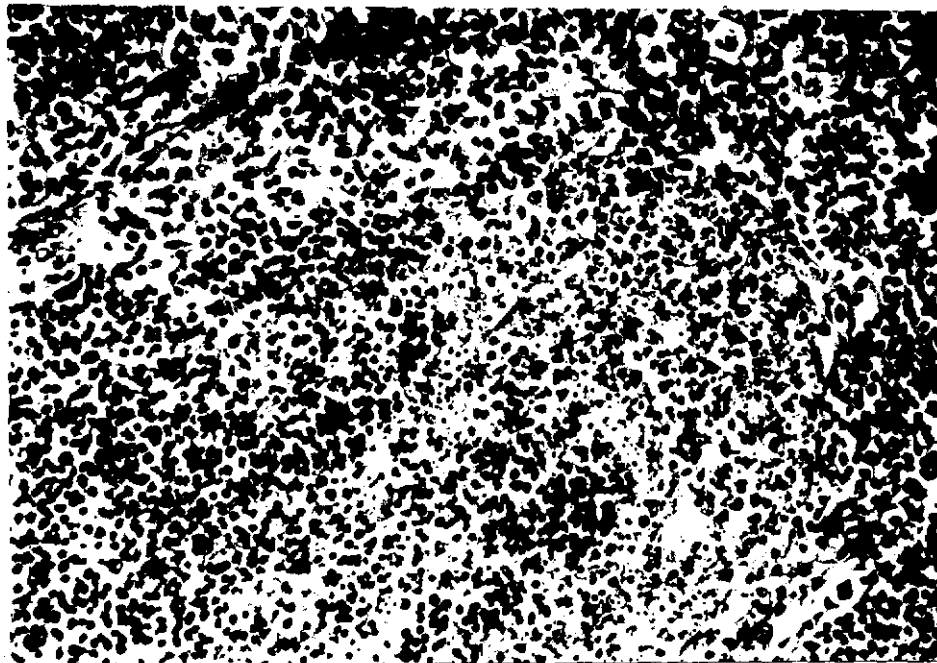


Figura 5. Amígdala de asno No. 8, día 4, PI. Necrosis de células linfáticas con restos nucleares. HE 450 X.

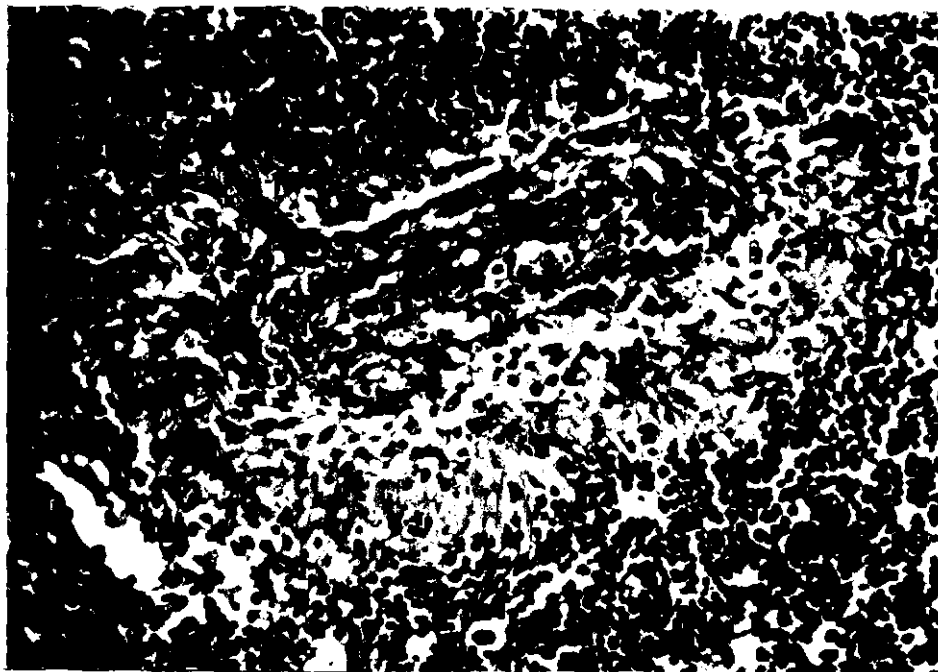


Figura 6. Ganglio linfático prescapular de asno No. 11, día 6, PI. Vasculitis necrótica con hiperplasia de células endoteliales. HE 900 X.

Hígado.

- Hora 24 Metamorfosis grasa difusa en zona paracentral de lobulillos hepáticos.
- Hora 48, 72, 96. Metamorfosis grasa en zona paracentral de lobulillos hepáticos (Figura 6).
- Hora 120 Metamorfosis grasa difusa.
- Hora 144 Metamorfosis grasa en zona paracentral de lobulillos hepáticos, dilatación de sinusoides con hiperemia.
- Hora 168 Metamorfosis grasa difusa y dilatación de sinusoides.
- Hora 192 Metamorfosis grasa difusa y necrosis de coagulación focal y difusa con restos celulares (Figura 7).
- Grupo Control Una ligera metamorfosis grasa no comparable a la de los asnos inoculados fue observada.

Riñón.

- Hora 24 Histológicamente normal.
- Hora 48 Dilatación vascular con hiperemia en zona cortical.
- Hora 72 Infiltración mixta de linfocitos, eosinófilos y plasmocitos en zona cortical.

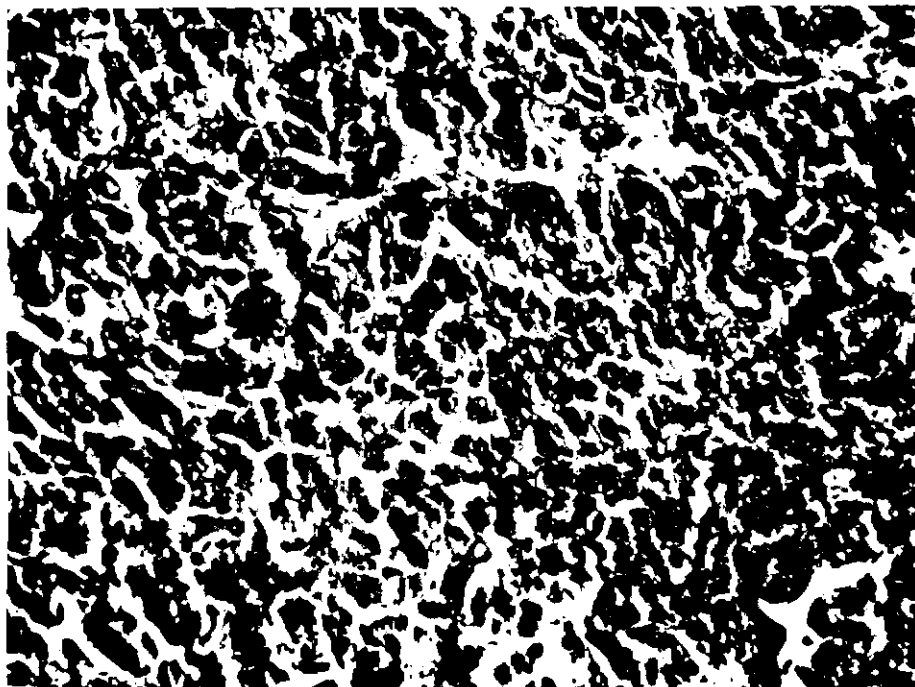


Figura 7. Páncreas de asno No. 12, día 6, PI. Necrosis pancreática enzimática con disociación de la arquitectura. HE 450 X.

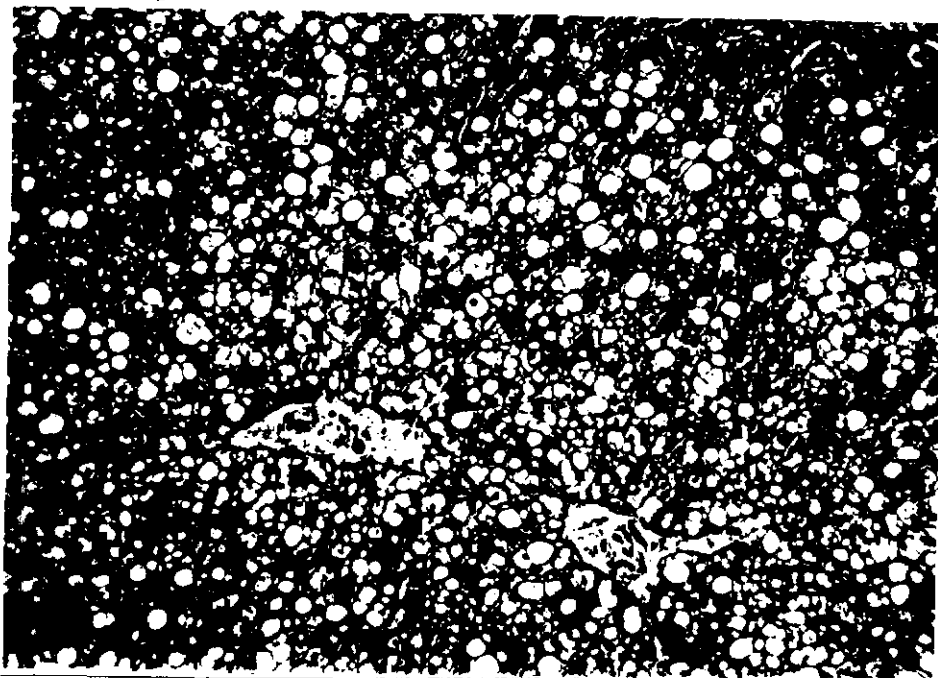


Figura 8. Hígado de asno No. 5, día 3, PI. Metamorfosis grasa en los hepatocitos en la periacinar. HE 900 X.

- Hora 96 Degeneración hidrópica de células epiteliales en tubulos renales con necrosis de coagulación tubular extensa en zona cortical (Figura 10).
- Hora 120 Degeneración hidrópica de células epiteliales en tubulos renales en zona cortical e infiltración linfocitaria alrededor de los vasos.
- Hora 144 Focos de infiltración mixta de linfocitos y células plasmáticas en zona cortical.
- Hora 168 Focos de infiltración linfocitaria alrededor de glomérulos en zona cortical.
- Hora 192 Necrosis de coagulación extensa en tubulos renales de zona cortical.

Grupo
Control Histológicamente normal.

Sublingual.

- Hora 24, 48. Histológicamente normal.
- Hora 72 Infiltración de células plasmáticas en el estroma glandular, desorganización de la arquitectura, con degeneración hidrópica y albuminosa de células acinares.
- Hora 96 Infiltración mixta de polimorfonucleares y linfocitos en las trabéculas conjuntivas. Desorganiza-

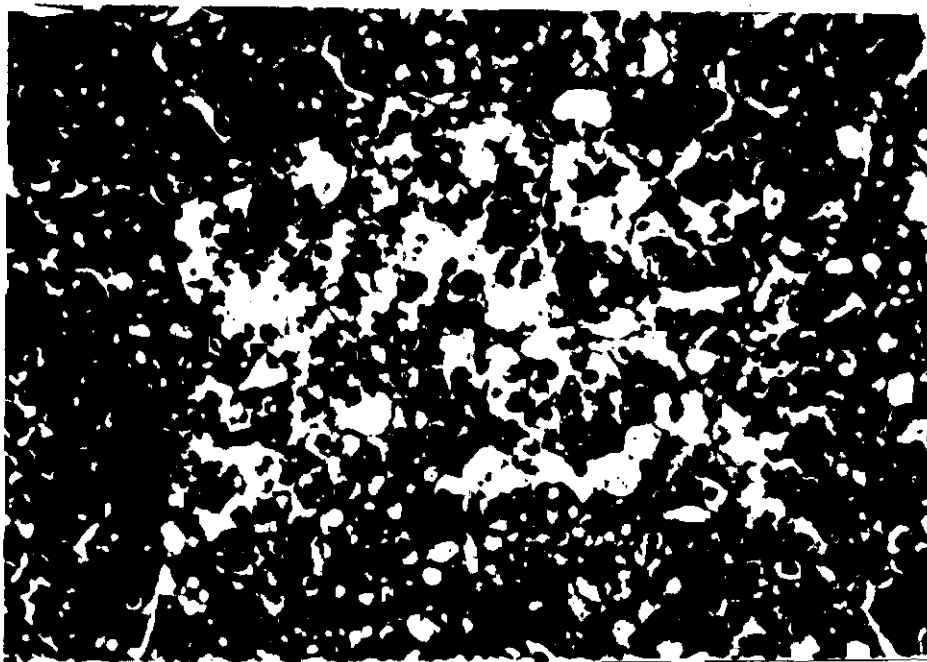


Figura 9. Hígado de asno No. 15, día 8, PI. Necrosis focal hepática de coagulación. HE 900 X.

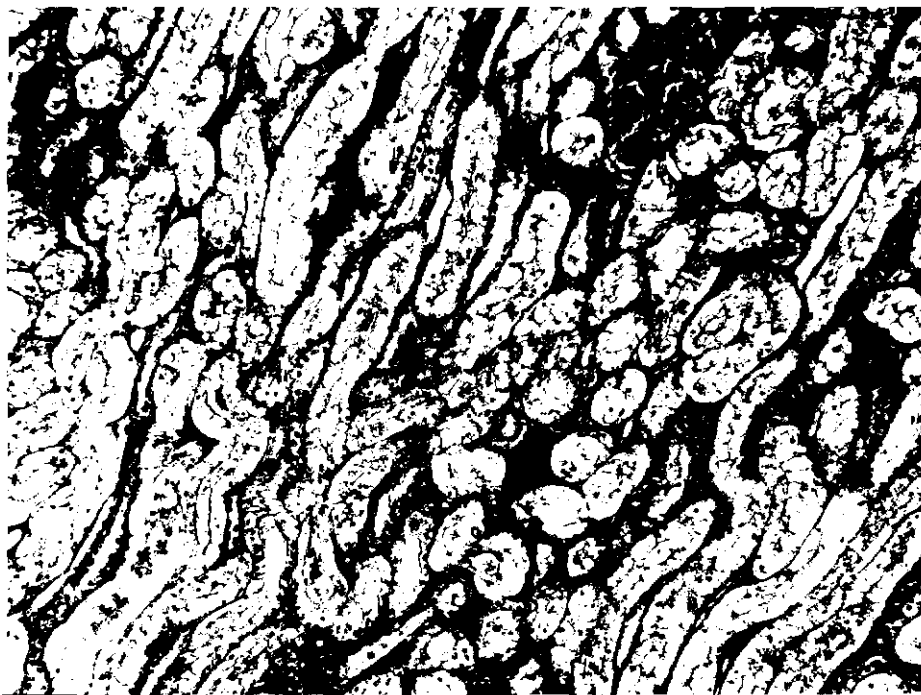


Figura 10. Riñón de asno No. 7, día 4, PI. Necrosis de coagulación extensa de tubulos renales en zona cortical. HE 900 X.

ción de la arquitectura glandular con degeneración hidrópica y albuminosa.

Hora 120 Desorganización de la arquitectura glandular con degeneración hidrópica y albuminosa de células acinares (Figuras 11 y 12).

Hora 144 Desorganización de acinos glandulares con degeneración albuminosa de células acinares.

Hora 168, 192. Desorganización de la arquitectura glandular con degeneración albuminosa e hidrópica de células acinares.

Grupo Histológicamente normal.
Control

Aorta.

Todos los grupos presentaban pérdida de las fibras elásticas de la capa media, ausencia de núcleos y vasculitis debidas posiblemente a deficiencia de selenio o deficiencia de vitamina A. Los grupos controles presentaron cambios semejantes.

Corazón.

Histológicamente normal en todos los grupos incluyendo el grupo control.



Figura 11. Glándula sublingual de asno No. 9, día 5, PI. Desorganización de la arquitectura con degeneración hidrópica (1) y parenquimatosa (2). HE 450 X.

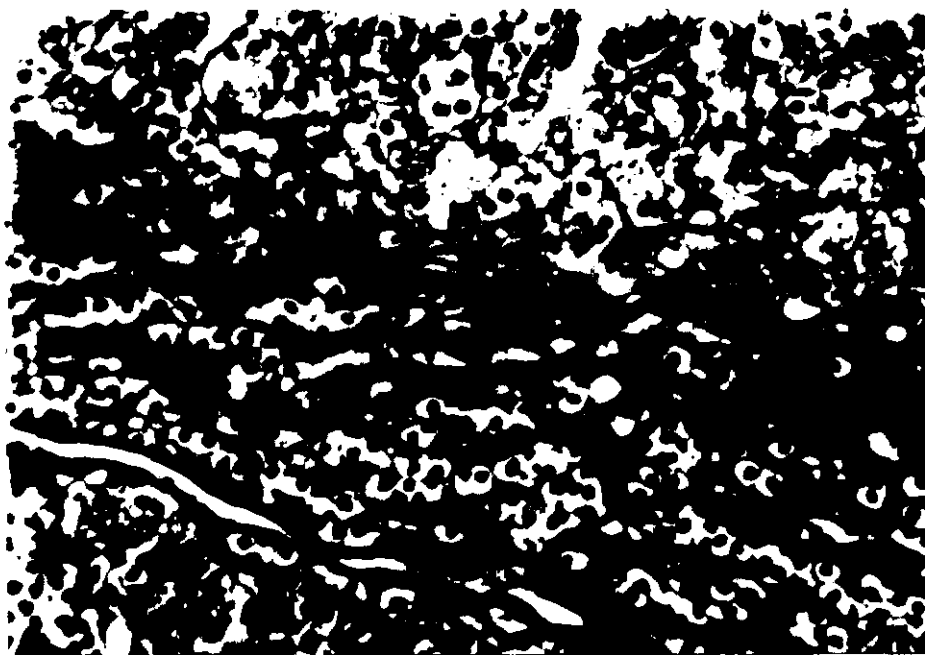


Figura 12. Glándula sublingual de asno No. 9, día 5, PI. Trabécula conjuntiva infiltrada por células polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos. HE 450 X.

Esófago.

Histológicamente normal en todos los grupos incluyendo el grupo control.

Hipófisis.

En las horas 144, 168 y 192 presentaban dilatación vascular con hiperemia en la neurohipófisis. En la adenohipófisis se observó alteración de la arquitectura y degeneración hidrópica.

Intestino delgado y grueso.

Infiltración eosinofílica marcada en la mucosa y submucosa fue reconocida en todos los grupos incluyendo los controles, estos cambios son atribuibles a infección parasitaria.

Labio, lengua, músculo semitendinoso, ovario, paladar, pene, tráquea, útero y tiroides histológicamente normal en todos los grupos incluyendo el grupo control.

Pulmón.

Una neumonitis de origen parasitario fué reconocida en las horas 48, 72, 96, 120, 144 y 192 con presencia de fibrina y exudado inflamatorio en bronquios y alveolos.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Corteza.

Hora 24,

48, 72, Histológicamente normal.

96, 120.

Hora 144 Gliosis focal y difusa, satelitosis, reacción linfocitaria perivascular, infiltración focal y difusa de polimorfonucleares neutrófilos, focos de hemorragia.

Hora 168 Gliosis focal y difusa, reacción perivascular linfocitaria, infiltración focal y difusa de polimorfonucleares neutrófilos, necrosis neuronal focal (Figura 14).

Hora 192 Gliosis focal, satelitosis, reacción perivascular linfocitaria, infiltración neutrofílica focal y difusa, necrosis neuronal focal (Figuras 13 y 16).

Grupo

Gliosis y satelitosis.

Control

Corpus Callosi.

Hora 24,

48, 72, Histológicamente normal.

96, 120.

Hora 144 Gliosis difusa.
Hora 168 Gliosis difusa marcada.
Hora 192 Gliosis focal y difusa, reacción linfocitaria perivascular, infiltración focal y difusa de polimorfonucleares neutrófilos, necrosis de microglia.

Grupo Histológicamente normal.

Control

Putamen.

Hora 24, Histológicamente normal.
48, 72,
96, 120.

Hora 144 Gliosis focal y difusa, satelitosis, reacción perivascular linfocitaria, infiltración focal y difusa de polimorfonucleares neutrófilos.

Hora 168 Gliosis difusa.

Hora 192 Gliosis difusa, satelitosis, reacción linfocitaria perivascular linfocitaria.

Grupo Histológicamente normal.

Control

Puente.

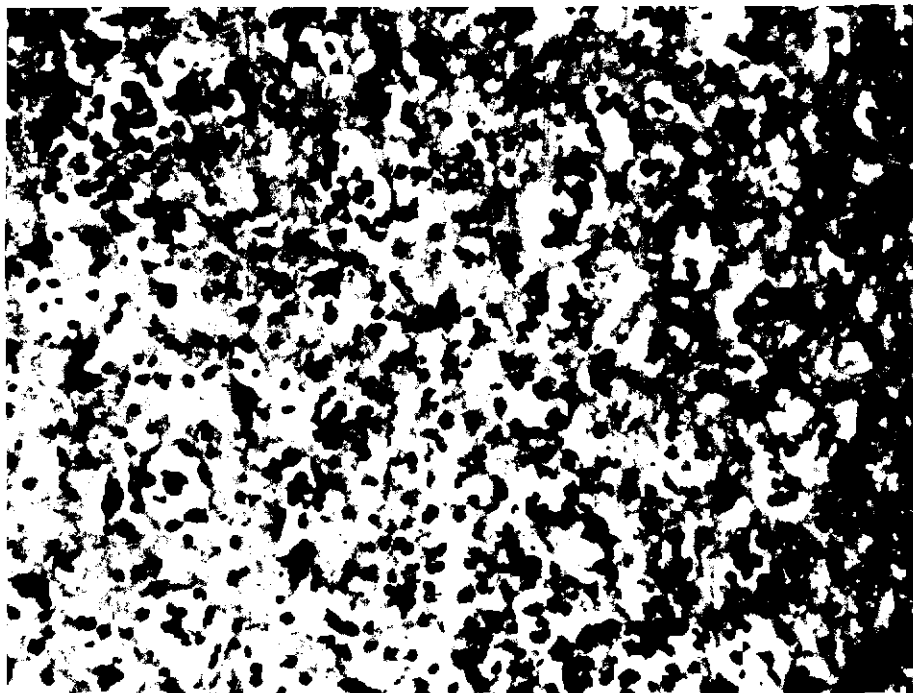


Figura 13. Corteza cerebral de asno No. 16, día 8, PI. Infiltración mixta de neutrófilos y linfocitos con necrosis neuronal (flechas). HE 450 X.

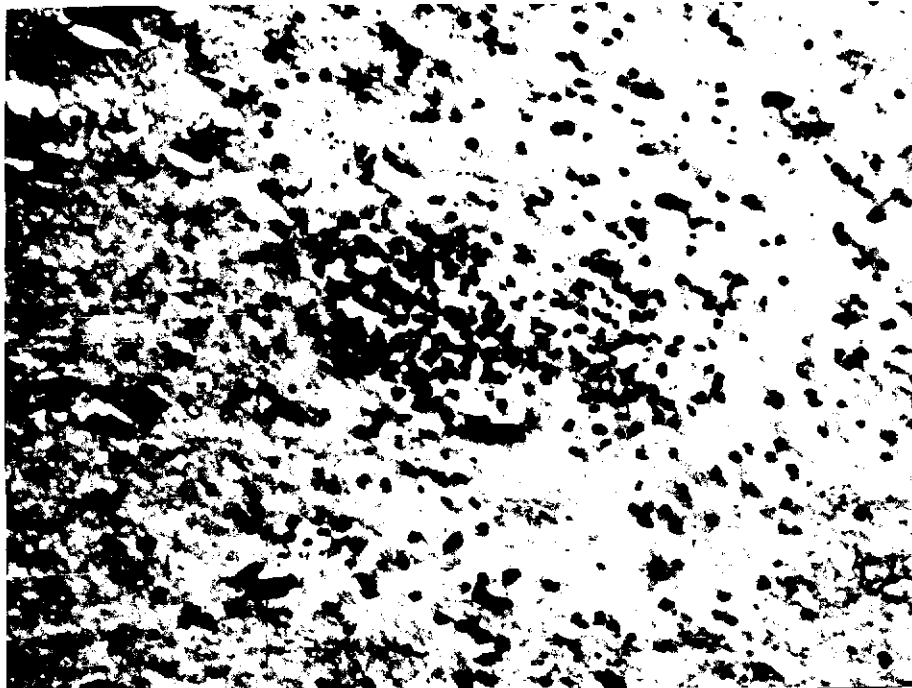


Figura 14. Corteza cerebral de asno No. 13, día 7, PI. Foco de gliosis de tipo microglia. Tricromica de Masson 450 X.

- Hora 24, Histológicamente normal.
48, 72,
120.
- Hora 96 Infiltración neutrofílica focal.
- Hora 144 Gliosis difusa y satelitosis.
- Hora 168 Gliosis focal y difusa, reacción linfocitaria perivascular y necrosis de microglia.
- Hora 192 Gliosis focal y difusa, infiltración focal de polimorfonucleares neutrófilos, reacción linfocitaria perivascular, necrosis de microglia.
- Grupo
Control Histológicamente normal.
- Hipocampo.
- Hora 24, Histológicamente normal.
48, 72,
96, 120.
- Hora 144 Gliosis difusa.
- Hora 168 Gliosis difusa, infiltración focal de polimorfonucleares neutrófilos reacción linfocitaria perivascular.
- Hora 192 Gliosis focal y difusa, infiltración de polimorfonucleares neutrófilos, reacción linfocitaria perivascular.

Grupo
Control Histológicamente normal.

Cerebelo.

Hora 24, Histológicamente normal.
48, 72,
96, 120,
144.

Hora 168 Infiltración focal de polimorfonucleares neutrófilos en capa molecular.

Hora 192 Gliosis focal, infiltración focal y difusa de polimorfonucleares neutrófilos en capa molecular, infiltración linfocitaria perivascular y necrosis focal de liquefacción comprometiendo las células de Purkinje. (Figura 16).

Grupo
Control Histológicamente normal.

Medula Espinal

Porción Cervical

Proliferación de células de oligodendroglia en varios grados y satelitosis fueron reconocidos en las horas 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 en la sustancia gris. En el grupo control se observó satelitosis y gliosis.

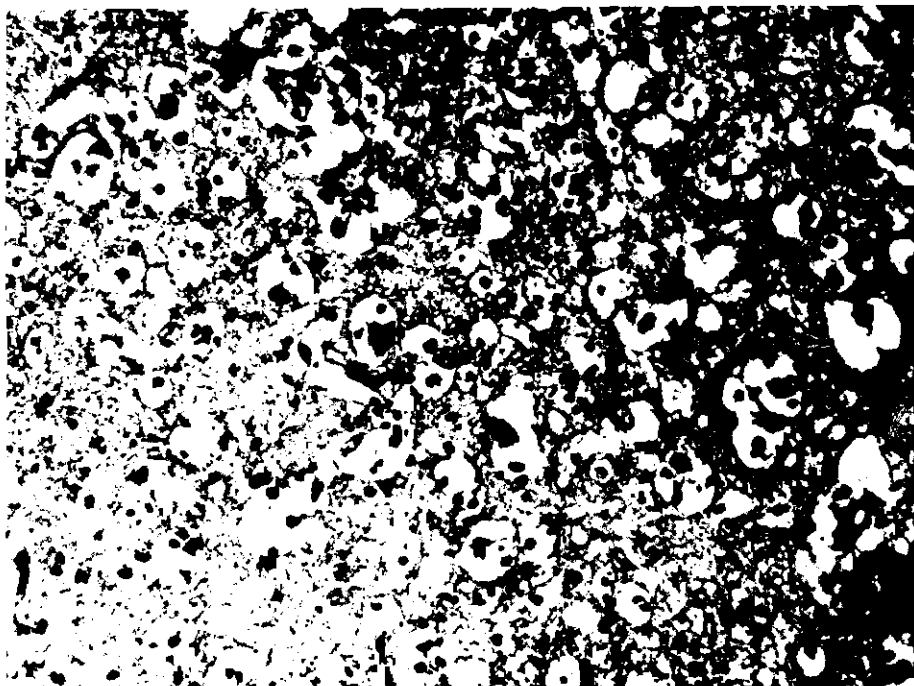


Figura 15. Corteza cerebral de asno No. 16, día 8, PI. Necrosis extensa de neuronas (flechas). Tricrómica de Masson 450 X.

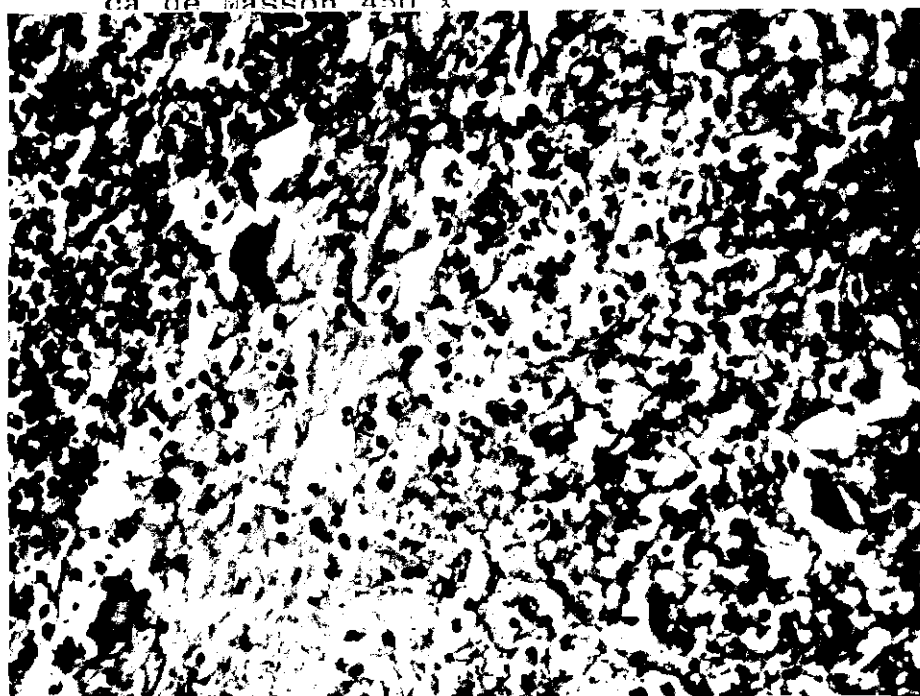


Figura 16. Cerebelo de asno No. 16, día 8, PI. Necrosis focal en capa molecular, comprometiendo las células de Purkinje. HE 450 X.

Porción Torácica.

Proliferación de células de oligodendroglia y satelitosis fue reconocida en las horas 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 en sustancia gris. En el grupo control se observó satelitosis y gliosis.

Porción lumbar.

Proliferación de células de oligodendroglia y satelitosis en las horas 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 en sustancia gris. En el grupo control se observó satelitosis.

Porción Sacra.

Proliferación de células de oligodendroglia y satelitosis fue reconocida en las horas 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 en sustancia gris. Un asno de la hora 168 presentó una reacción inflamatoria alrededor de neuronas y vasos sanguíneos de células de tipo polimorfonucleares neutrófilos.

Grupo Control. Se observó satelitosis.

Resumen de los hallazgos microscópicos encontrados están consignados en las tablas 4 y 5 y distribución de las lesiones por regiones anatómicas del sistema nervioso central (SNC) están consignadas en las tablas 6 y 7.

TAULA 4. HALLAZGOS MICROSCOPICOS EN VARIOS ORGANOS DE 16 ASNOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.

	DIA 1 HORA 24	DIA 2 HORA 48	DIA 3 HORA 72	DIA 4 HORA 96	DIA 5 HORA 120	DIA 6 HORA 144	DIA 7 HORA 168	DIA 8 HORA 192
ADRENAL	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	FOCOS DE INFILTRACION LINFOCITARIA. DEGENERACION HI-DROPICA.	DEGENERACION HI-DROPICA.	DEGENERACION HI-DROPICA.	DEGENERACION HI-DROPICA.	DEGENERACION HI-DROPICA.	NECROSIS FOCAL MULTIPLE.	DEGENERACION HI-DROPICA. NECROSIS FOCAL.
AMIGDALA	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS LIGERA.	INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS LIGERA.	NECROSIS CELULAR MARCADA EN NODULOS LINFATICOS.	INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS CELULAR LIGERA.	NECROSIS CELULAR MARCADA.	INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS CELULAR LIGERA.	DEPOBLACION DE NODULOS LINFATICOS.
BAZO	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	DEPOSICION DE FIBRINA EN NODULOS DE MALPIGHI.	DEPOBLACION DE CENTROS GERMINALES EN FOLICULOS DE MALPIGHI.	DEPOBLACION DE CENTROS GERMINALES.	DEPOBLACION DE ELEMENTOS LINFOIDES EN NODULOS DE MALPIGHI. PRESENCIA DE FIBRINA.	DEPOBLACION DE ELEMENTOS LINFOIDES EN NODULOS DE MALPIGHI. PRESENCIA DE FIBRINA.	DEPOBLACION DE CELULAS LINFATICAS EN NODULOS DE MALPIGHI.	DEPOBLACION DE CELULAS LINFATICAS EN NODULOS DE MALPIGHI.
NODULO LINFATICO PRESCAPULAR	DEPOSICION DE FIBRINA EN CENTROS GERMINALES.	HEMORRAGIA, INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS CELULAR LIGERA.	INFILTRACION EOSINOFILICA. HEMORRAGIA Y PRESENCIA DE FIBRINA. NECROSIS CELULAR MARCADA.	INFILTRACION NEUTROFILICA. PRESENCIA DE FIBRINA. NECROSIS CELULAR MARCADA.	HIPEREMIA VASCULAR. NECROSIS CELULAR LIGERA.	INFILTRACION NEUTROFILICA. PRESENCIA DE FIBRINA. VASCULITIS NECROTICA.	HEMORRAGIA DIFUSA, VASCULITIS NECROTICA EN VASOS TRABECULARES.	INFILTRACION NEUTROFILICA. VASCULITIS NECROTICA EN TRABECULAS.
PANCREAS	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA. PERDIDA DE CITOPLASMA. NECROSIS FOCAL.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA. DEGENERACION GRASA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA. NECROSIS PANCREATICA AGUDA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA.
HIGADO	METAMORFOSIS GRASA.	METAMORFOSIS GRASA.	METAMORFOSIS GRASA EXTENSA.	METAMORFOSIS GRASA LIGERA.	METAMORFOSIS GRASA EXTENSA.	METAMORFOSIS GRASA EXTENSA.	METAMORFOSIS GRASA DIFUSA.	METAMORFOSIS GRASA DIFUSA. NECROSIS CELULAR MARCADA.
RINON	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HIPEREMIA VASCULAR.	NECROSIS TUBULAR MARCADA.	NECROSIS TUBULAR. DEGENERACION HI-DROPICA.	DEGENERACION HI-DROPICA. FOCOS DE INFILTRACION LINFOCITARIA.	FOCOS DE INFILTRACION LINFOCITARIA.	NECROSIS TUBULAR EN ZONA CENTRAL.
SUBLINGUAL	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA CON DEGENERACION HI-DROPICA Y ALBUMINOSA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA CON CAMBIOS DEGENERATIVOS. INFILTRACION NEUTROFILICA EN TRABECULAS.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA CON DEGENERACION HI-DROPICA Y ALBUMINOSA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA CON DEGENERACION HI-DROPICA Y ALBUMINOSA.	ALTERACION DE LA ARQUITECTURA CON DEGENERACION HI-DROPICA Y ALBUMINOSA.

TABLA 5. HALLAZGOS MICROSCOPICOS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE 16 ASNOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.

	DIA 1 HORA 24	DIA 2 HORA 48	DIA 3 HORA 72	DIA 4 HORA 96	DIA 5 HORA 120	DIA 6 HORA 144	DIA 7 HORA 168	DIA 8 HORA 192
CORTEZA	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA SATELITOSIS. INFILTRACION DE POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS, HEMORRAGIA.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. INFILTRACION NEUTROFILICA. REACCION PERIVASCULAR LINFOCITARIA. NECROSIS NEURONAL FOCAL.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA SATELITOSIS. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR. INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS NEURONAL FOCAL.
CORPUS CALLOSI	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS DIFUSA.	GLIOSIS DIFUSA MARCADA.	GLIOSIS DIFUSA MARCADA.
CORPUS FORNICIS	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS DIFUSA Y SATELITOSIS.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR. INFILTRACION NEUTROFILICA.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR. INFILTRACION NEUTROFILICA.
PUTAMEN	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA SATELITOSIS. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. SATELITOSIS. REACCION PERIVASCULAR LINFOCITARIA. INFILTRACION NEUTROFILICA.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. SATELITOSIS. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR.
TALAMO	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS DIFUSA. NECROSIS CON RESTOS CELULARES.	GLIOSIS DIFUSA.	GLIOSIS DIFUSA, SATELITOSIS, REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR.
PUENTE	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS DIFUSA Y SATELITOSIS.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR. NECROSIS DE MICROGLIA.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. REACCION LINFOCITARIA PERIVASCULAR. INFILTRACION NEUTROFILICA.
HIPOCAMPO	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	GLIOSIS DIFUSA.	GLIOSIS DIFUSA.	GLIOSIS DIFUSA.
CEREBELO	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	HISTOLOGICAMENTE NORMAL.	INFILTRACION NEUTROFILICA.	GLIOSIS FOCAL Y DIFUSA. INFILTRACION NEUTROFILICA. NECROSIS FOCAL DE LEQUEFACCION.

TABLA 6. INCIDENCIA DE LESIONES POR REGIONES ANATOMICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ENCONTRADOS EN 16 ASNOS INOCULADOS CON VIRUS DE EEV.

<u>REGION ANATOMICA</u>	<u>REACCION PERIVASCULAR</u>	<u>INFILTRACION NEUTROFILICA</u>		<u>NECROSIS</u>	<u>SATELITOSIS</u>	<u>GRADOS DE GLIOSIS</u>	
		<u>FOCAL</u>	<u>DIFUSA</u>			<u>FOCAL</u>	<u>DIFUSA</u>
CORTEZA	6	6	6	4	6	6	6
CORPUS CALLOSI	0	0	0	0	0	0	6
CORPUS FORNICIS	4	4	4	0	0	6	6
PUTAMEN	6	6	6	0	6	6	6
TALAMO	4	0	0	2	6	0	6
PUENTE	4	2	2	0	0	4	6
HIPOCAMPO	6	2	2	0	0	4	6
CEREBELO	2	2		2	0	4	0

TABLA 7. INCIDENCIA DE LESIONES ANATOMICAS EN
EN LA MEDULA ESPINAL ENCONTRADOS EN
16 ASNOS INOCULADOS CON VIRUS DE EEV.

	HORA 24	HORA 48	HORA 72	HORA 96	HORA 120	HORA 144	HORA 168	HORA 192
M. CERVI	-	GLIOSIS	GLIOSIS	GLIOSIS	GLIOSIS SATELITO SIS.		GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS
M. TORAX	-	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.
M. LUMBAR	-	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.
M. SACRA	-	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.	GLIOSIS SATELITO SIS.

DISCUSION

En el presente estudio asnos inoculados con virus de encefalomiелitis equina venezolana (EEV) fueron susceptibles a la infección con inoculación de 20 RAIPDL₅₀. Estos hallazgos están estrechamente relacionados con los trabajos de Kissling et al (31) quienes reprodujeron la enfermedad con 32 DL₅₀ en caballos.

OBSERVACIONES CLINICAS:

Los síntomas observados en los asnos inoculados fueron primeramente una elevación de temperatura, la cual fué constante en casi todos los animales a partir del día 2 post-inoculación y se mantuvo hasta el día de sacrificio de cada grupo. Síntomas generales fueron observados en la mayoría de ellos y en dos animales se observaron síntomas clásicos de encefalomiелitis a partir del día 6 después de haber sido inoculados. De lo anterior podemos asumir que la cantidad inoculada fue suficiente para reproducir la enfermedad (Tabla 1). Los hallazgos anteriores están de acuerdo con los trabajos de Gleiser et al (24) y por Kissling et al (31).

PATOLOGIA CLINICA:

Hematología. El virus fue recobrado de la sangre inicial-

mente en los animales 24 horas post-inoculación. Posteriormente se aisló de la mayoría de estos 48 horas después de inoculados, con excepción de 5 animales de los cuales se aisló más tarde. El título más alto se encontró 72 horas después de la inoculación y su valor fue igual a 7.0 logarítmicos. La viremia es la secuencia a la infección viral y tiene como fuentes principales de mantenimiento el hígado, el bazo, medula osea y el tejido linfoide (19). Lo anterior está estrictamente relacionado con los trabajos de Kissling et al (31) quienes encontraron en caballos títulos máximos de $10^{4.5}$ y $10^{7.4}$ inoculados con 32 DL₅₀.

Los valores absolutos del hematocrito sufrieron un descenso considerable a partir de la hora 48 (Figura 3) alcanzando sus niveles más bajos en la hora 84. Podría insinuarse que existe una asociación del virus con los leucocitos totales lo que ocasionaría destrucción de estos (19) o quizás la dilatación vascular ocasionaría la mayor concentración de éstas células en la red vascular lo cual explicaría la baja de estos en la sangre periférica. El descenso de la hemoglobina fué proporcional a la baja de los valores hematocritos lo que nos hace suponer un daño de las células rojas (Figura 4) lo que explicaría su descenso.

Durante la infección se observó una leucopenia absolu-

ta siendo las células más comprometidas los linfocitos, los cuales decrecieron a partir de la hora 36 (Figura 2) y alcanzando su nivel más crítico en la hora 84 permaneciendo estacionarios hasta el día de sacrificio en las horas 144, 168 y 192. La asociación que el virus puede tener en estas células y quizás un crecimiento y la destrucción de ellas, puede ser la causa de la linfopenia (19). Los neutrófilos presentan un descenso marcado en la hora 84 no comparable con la baja de los linfocitos. Los eosinófilos estuvieron comprometidos seriamente en la infección ya que al empezar el estudio la eosinofilia era marcada; después de la infección decrecieron gradualmente a partir de la hora 48 (Figura 2) y desaparecieron después de la hora 96. La participación de estas células en la infección es desconocida. Estos hallazgos corroboran los de Gleiser et al (24) quienes encontraron una marcada linfopenia en burros infectados con virus de EEV. Nuestro estudio discrepa de los hallazgos de Kissling et al (31) quienes reportan primeramente una neutropenia y luego una linfopenia, igualmente no mencionan cambios en los eosinófilos lo cual se observó en nuestro estudio.

OBSERVACIONES POST-MORTEM:

Patología Macroscópica. Una congestión cerebral fue obser-

vada en la hora 192 coincidiendo con los síntomas encefálicos lo que nos hace suponer que los cambios vasculares y el daño cerebral produjeron el éxtasis de la corriente sanguínea con la consiguiente congestión cerebral.

Patología Microscópica. La degeneración hidrópica y la necrosis focal observada en la glándula adrenal, nos hace suponer que el proceso febril inducido por la multiplicación viral y el daño tisular, ocasionaría daños celulares a nivel de las mitocondrias, que por acción continuada, ocasionaría la muerte celular (56). Lo anterior coincide con lo descrito por Gleiser et al (24) quienes reportaron cambios similares a los hallados en nuestro estudio en burros y discrepan de los de Kissling et al (31) quienes no describen cambios en glándulas adrenales de caballos infectados experimentalmente.

La infiltración neutrofilica y la necrosis celular de células linfáticas en amígdala (Figura 5), nos hace suponer que el virus selecciona las células del tejido linfoide, a donde llegan por vía linfática o sanguínea, transportados por macrófagos o linfocitos, las que disponen de receptores específicos una vez en el interior de las células los viriones se multiplican y producen necrosis celular que conllevan a cambios inflamatorios lo que produciría aflujos

de neutrófilos alrededor de los focos necróticos (19, 41, 44).

Los cambios observados en el ganglio prescapular y submandibular revelaron una vasculitis necrótica con hiperplasia de células endoteliales, presencia de fibrina la cual fué negativa a las coloraciones del ácido periódico y de Weigert, infiltración neutrofílica abundante y necrosis celular de células linfáticas; los mecanismos de agresión del virus en este órgano ya fue descrito anteriormente. La hiperplasia de las células endoteliales en los vasos sanguíneos y la vasculitis necrótica nos hace suponer la posibilidad del crecimiento del virus en las células endoteliales lo que ocasionaría la hiperplasia, y seguidamente la necrosis vascular (Figura 6). Lo anterior estaría de acuerdo con lo reportado por Gleiser et al (24) quienes describen cambios similares en los hallados por nosotros.

En el páncreas se observó desorganización de la arquitectura y necrosis focal (Figura 7) lo que nos hace suponer la acción pantrópica del virus, el cual actuaría sobre las células pancreáticas liberandose enzimas que originarían los focos de necrosis (53).

Los cambios observados en el bazo fueron poco significativos reconociéndose solamente una depoblación de células

linfáticas en los nódulos de Malpighi, y abundante hemosiderina. El mecanismo por el cual el virus de EEV no produce cambios severos en este órgano no es bien conocido. La depoblación de células linfáticas se explicaría como una demanda de células linfáticas, compensatoria a la linfopenia. La hemosiderina explicaría la destrucción de globulos rojos durante la infección pero esto se observó también en los testigos. Lo anterior está de acuerdo con los reportes de Gleiser et al (24) y Kissling et al (31) quienes solo describen pérdida de células linfáticas, abundante hemosiderina y hemorragia la cual no fue reconocida en nuestro estudio.

La metamorfosis grasa y la necrosis hepática (Figuras 8 y 9) podrían ser explicadas por la acción hepatotóxica del virus que actuaría sobre el sistema respiratorio de los hepatocitos, lo cual ocasionaría una disminución del ATP produciendose la metamorfosis grasa, lo que llevaría posteriormente a la necrosis de los hepatocitos (44, 53). Otra posibilidad sería la hipoxia y desnutrición con baja de proteínas, que ocasionaría la acumulación de grasa y haría más vulnerable este órgano a la acción del virus. Lo anterior estaría parcialmente de acuerdo con Gleiser et al (24) quienes encontraron necrosis hepática en burros con infiltración celular la cual no fue observada en nuestro estudio. No se

observó degeneración albuminosa ni focos de hematopoyesis como lo describen Kissling et al (31) en hígado de caballos infectados experimentalmente.

La degeneración hidrópica y la necrosis tubular extensa encontradas en riñón (Figura 10), pueden explicarse por el fenómeno febril inducido por el virus, lo que ocasionaría la degeneración hidrópica y la necrosis de las células de revestimiento de los tubulos contorneados proximales (53).

Los cambios de degeneración hidrópica y albuminosa, infiltración neutrofílica en las trabéculas conjuntivas y desorganización de la arquitectura (Figuras 11 y 12) en la glándula sublingual, podrían explicarse por la acción pancreática del virus produciendo como otros virus cambios degenerativos en esta glándula (56). Kissling et al (31) no reportan estos cambios observados por nosotros en nuestro estudio.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC):

Ninguna lesión microscópica fué observada en los animales sacrificados los cinco primeros días con excepción de un solo caso de la hora 92 en la cual se observó un pequeño foco de polimorfonucleares neutrófilos. Lo anterior nos hace suponer que el virus de EEV no es esencialmente

neurotrópico, puesto que las lesiones fueron reconocidas en fase avanzada de la infección, lo que nos indica que probablemente la barrera hematoencefálica obra como un mecanismo defensivo en los estados iniciales de la infección (20, 28). Contrario a nuestros hallazgos, Kissling et al (31) describieron lesiones hemorrágicas, y moderada infiltración neutrofílica en animales sin síntomas de encefalomiелitis, lo cual no fué observado en nuestro estudio. Lo anterior nos haría suponer que el inóculo empleado en nuestro estudio fue relativamente poco para producir tempranamente estos cambios, en contraposición a la dosis empleadas por los autores arriba mencionados.

El primer cambio observado, se reconoció el día 4 post-inoculación en la región del puente en un solo animal, consistente en un pequeño foco de infiltración de polimorfonucleares neutrófilos. Las lesiones se hicieron más notorias a partir del día 6 con reacción de las células de oligodendroglia y satelitosis; el día 7 PI los cambios se acentuaron especialmente en la corteza cerebral y en menor grado en el puente, corpus fornicis, putamen, tálamo e hipocampo, consistentes en gliosis focal (Figura 14) y difusa, reacción linfocitaria perivascular, infiltración focal difusa de neutrófilos y linfocitos (Figura 13). Las lesiones progresaron en el día 8 post-inoculación siendo los cambios

más marcados en la corteza cerebral donde se observó necrosis neuronal focal (Figura 15). La satelitosis se debe a cambios hipóxicos por baja en la concentración de oxígeno lo que induce a cambios degenerativos.

La presencia de las células de oligodendroglia tanto focal como difusa nos indican la participación que estas células como mecanismo defensivo tienen, ya que obran como macrófagos en presencia de un estímulo en un intento defensivo. La marginación leucocitaria de tipo linfocitario se explica como un cambio en la distribución de los elementos figurados de la sangre y es característico de muchos procesos virales, tales como la Rabia, la Encefalomieltis Porcina y la Enfermedad de Borna entre otras.

El fenómeno de la necrosis neuronal, se explicaría por la entrada del virus procedente de la corriente sanguínea a través de las células endoteliales, siendo el sitio menos probable la zona de permeabilidad capilar. Una vez en el tejido nervioso, el virus hace selección por las neuronas y células de microglia donde parecen haber receptores específicos que las hacen más susceptibles que cualquiera otras. El virus ingresa por viropexis a las células nerviosas donde utiliza el mecanismo bioquímico de la célula para replicarse produciendo un efecto citocida en éstas, libran-

dose mediadores químicos que atraen células inflamatorias de tipo polimorfonuclear neutrófilo, o quizás el daño celular se deba a una respuesta de tipo inmunitario (29, 39, 69). Gleiser et al (24) reconocieron lesiones más severas en el tálamo y cerebro medio y en menos intensidad en la corteza cerebral lo cual está en desacuerdo con nuestro estudio puesto que la severidad de las lesiones fueron halladas en la corteza cerebral. Igualmente Kissling et al (31) no describen diferencias significativas en diferentes áreas del cerebro lo que discrepa de nuestros hallazgos. Los hallazgos de Roberts et al (52) están parcialmente de acuerdo con nuestro estudio a pesar de que este estudio fue de un brote natural no conociéndose la cantidad inoculada y la secuencia de la infección, encontrándose lesiones más severas que en nuestro estudio.

En el cerebelo, la distribución de las lesiones y el grado de estas fue menor que en el cerebro observándose en el día 7 post-inoculación infiltración focal de polimorfonucleares neutrófilos. Las lesiones progresaron el día 8 PI presentándose mayor intensidad en la respuesta inflamatoria consistentes en infiltración neutrofílica, reacción linfocitaria perivascular y necrosis de las células de Purkinje (Figura 16). Los mecanismos por los cuales se suceden estos cambios ya fueron discutidos.

Los segmentos cervical, torácico, lumbar y sacro de la médula espinal revelaron pocos cambios consistentes en gliosis y satelitosis observándose en un solo caso reacción inflamatoria de polimorfonucleares neutrófilos el día 7 post-inoculación alrededor de neuronas y vasos sanguíneos. El mecanismo por el cual el virus no lesiona más esta parte del sistema nervioso central (SNC) se puede invocar la ausencia de receptores específicos en estas células, que no es bien conocido, las hacen menos susceptibles que las células del cerebro. Gleiser et al (24) describen lesiones destructivas en la médula espinal lo cual no fué observado en nuestro medio.

En los títulos consignados en la Tabla 3, de la viremia en asnos inoculados con el virus de EEV, encontramos una correlación con las lesiones histopatológicas ya que estos se observaron primeramente en la hora 48 y progresaron en intensidad en las horas siguientes coincidiendo con una marcada elevación del virus en la sangre, lo cual hace suponer que a partir de una primera viremia en órganos linfoides su nivel se mantiene elevado posiblemente por replicación del virus en otros órganos diferentes del sistema linfático.

La distribución de las lesiones por regiones anatómicas

(Tabla 6) fueron inconstantes, puede asumirse que varios factores influyen en esto entre los que podemos aducir cantidad inoculada, edad del huésped y la susceptibilidad del huésped frente a la infección y la ausencia o presencia de receptores específicos que hace más vulnerables a las diversas células del sistema nervioso central.

RESUMEN

Un total de 16 asnos fueron inoculados con 20 RAIPDL₅₀ de virus de encefalomiелitis equina venezolana (EEV), vía subcutánea para estudios histopatológicos. La duración del experimento fué de 8 días, sacrificandose dos burros por día.

Clínicamente, se observó elevación de la temperatura en fases tempranas de la infección, y se mantuvo constante hasta el día de sacrificio de cada grupo. El virus, fué recobrado inicialmente 24 horas después de la inoculación obteniéndose títulos elevados durante la infección. Los valores hematocrito y de la hemoglobina, decrecieron en las fases iniciales de la enfermedad. Una linfopenia marcada se observó durante la infección, así como una neutropenia relativa y eosinopenia absoluta a partir de la hora 16 post-inoculación.

Macroscópicamente se observó una congestión cerebral en los animales del último grupo.

Lesiones microscópicas consistentes en infiltración neutrofílica, vasculitis necrótica con hiperplasia de células endoteliales y necrosis de células linfáticas, fueron observados en amígdala y el ganglio prescapular.

En la glándula adrenal se observó degeneración hidrópica, y focos de necrosis en la zona fascicular. En el bazo solamente se reconoció una depoblación de células linfáticas. En el hígado se observó una metamorfosis grasa en la zona periacinar y focos de necrosis. El páncreas presentó desorganización de la arquitectura y necrosis focal. En el riñón se observó degeneración hidrópica y necrosis de los tubulos contorneados proximales de la corteza renal. En glándula sublingual, se observó desorganización de la arquitectura, degeneración hidrópica y albuminosa e infiltración de polimorfonucleares neutrófilos en las trabéculas conjuntivas.

En el sistema nervioso se reconocieron cambios consistentes en satelitosis, gliosis focal y difusa, reacción linfocitaria perivascular, infiltración de polimorfonucleares neutrófilos, necrosis de neuronas y de células neurogliales especialmente en la corteza cerebral, donde se observó la mayor intensidad de la respuesta inflamatoria y en menor grado en el puente, corpus fornicis, putamen, tálamo e hipocampo.

En el presente estudio se demuestran los cambios hematológicos e histopatológicos en infección experimental del virus de la encefalomiелitis equina venezolana (EEV)

en asnos y se demuestra que las lesiones encontradas progresan en intensidad en relación al tiempo de exposición al virus, la susceptibilidad del animal y la cantidad inoculada.

BIBLIOGRAFIA

1. AVILAN, J. R. 1964. El brote de encefalitis equina Venezolana al norte del estado de Zulia a fines de 1963. Revista Venezolana de Sanidad y Asistencia Social. 29: 231-320.
2. BAQUERIZO, A. L.; and C. F. Marmol. 1958. Encefalitis a virus transmitidos por artrópodos. Revista Ecuatoriana de Higiene y Medicina Tropical. 15: 163-176.
3. BERGE, T. O.; G. French.; and D. Sills. 1958. Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis Part 3 viremia and antibodies in Trinidad VEE infected monkey's. Annual Report Fort Detrich. Maryland, U. S. Army Medical Unit. pp. 89-97.
4. BETTINOTTI, C. M. 1957. Incidencia de anticuerpos fijadores de complemento para virus de la encefalitis (cuatro especies) en la población general de Córdoba, Semana Médica. 110: 393-399.
5. BODIAN, D. 1954. Viremia in experimental poliomyelitis II Viremia and the mechanisms of the "provoking" effect of infections on trauma. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 60: 350.

6. BRUNO-LOBO M.; G. Bruno Lobo and J. Travassos. 1962.
Studies on the arboviruses II. The presence of antibodies to certain viruses of Group A and B in the sera of residents of Rio de Janeiro. In studies of the arboviruses. Year Book of the Institute of Microbiology. Rio de Janeiro, University of Brazil. pp. 155-181.
7. BYKOSKY, A. F.; F. I. Yershov.; and V. M. Zhdanov. 1969.
Morphogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Journal of Virology. 4: 496-504.
8. CAMPILLO SAINZ CARLOS Z. 1963. Infecciones por virus Arbor. Aspectos clínicos. Gaceta Médica Mexicana. 43 (5): 407-413.
9. CASALS, JORDI.; E. C. Curnen.; and L. Thomas. 1943.
Venezuelan equine encephalomyelitis in man. Journal Experimental Medicine. 77: 521-530.
10. _____, and W. C.; Reeve. 1965. The Arboviruses.
In Horsfall, F. L. Jr., and I. Tamm (eds), Viral and rickettsial infections of man. 4th ed, Philadelphia, J. B. L. pp. 580-582.
11. CARNEIRO, V. 1957. Equine encephalomyelitis in Brazil. Proc. Sixth Pacific, Sci. Congres. 5: 251-258.

12. CAUSEY, O. R.; and M. Theiller. 1958. Virus antibody survey on sera of residentes of the amazon valley in Brazil. American Journal Tropical Medicine and Hygienè. 7: 36-41.
13. COHN, Z. A.; 1964. The fate of bacteria within phagocytic cells III Destruction of an Escherichia coli agglutinogen within polymorfonuclear leucocytes and macrophages. Journal of Experimental Medicine. 120: 869.
14. CORONELL-SALMON. 1960. Investigación de anticuerpos para encefalomiелitis Venezolana por la prueba de seroneutralización. Revista Ecuatoriana de Higiene y Medicina Tropical. 17: 71-95.
15. CHAMBERLAIN, R. W.; N. D. Sudia.; P. H. Coleman and T. H. Work 1964. Venezuelan equine encephalomyelitis virus from south Florida. Science. 145: 272-274.
16. DOWNS, W. G.; L. Spence, and J. G. A. Borghans. 1963. Arthropod-borne encephalitis viruses in the west indies area V. A. serological survey of Curacao, N. W. I. Tropical and Geographical Medicine. 15: 237-242.

17. DOWNS, W. G.; L. Spence and T. H. G. Aitken. 1962.
Studies the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis in Trinidad. W. I. III Reisolation of virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2 (6): 841-843.
18. EKLUND, C. M. 1954. Mosquito transmitted encephalitis viruses. A review of their insect and vertebrate host and mechanisms for survival and dispersions. Experimental Parasitology. 3: 285-305.
19. FENNER, F. 1968. The pathogenesis and ecology of viral infections. In., The biology of animal viruses. New York Academic Press. V. 2.
20. FRIEDEMAN, N. 1943. Permeability of blood brain barrier to neutropic viruses A. M. A. Archives of Pathology. 35: 912.
21. GALINDO, P.; S. Srinongse.; E. De Rodaniche, and M. A. Grayson 1966. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panamá 1959-1962. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 15: 385-400.
22. GARMAN, JOHN L.; Willian. F. Scherer and Rorert. W. Dickerman. 1968. Study of equine virulence of naturally occurring Venezuelan encephalitis virus in Veracruz with description of antibody response.

Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 65:
238-252.

23. GILYARD, R. T. 1945. A clinical study Venezuelan virus of equine encephalomyelitis in Trinidad B. W. I. Journal American Veterinary Medical Association. 106: 267-277.
24. GLEISER, C. A.; W. S. Gochennour, Jr., R. O. Berge.; and W. D. Tigertt. 1962. The comparative pathology of experimental Venezuelan equine encephalomyelitis infection in different animal hosts. Journal Infection Diseases. 110: 80-97.
25. GRAYSON, A. MARGARET and Galindo Pedro. 1969. Ecology of Venezuelan equine encephalitis in Panamá. Journal American Medical Associations. 155 (12): 2142-2145.
26. GROOT, H.; A. Morales and H. Vidales. 1961. Virus isolation from forest mosquitos in San Vicente de Chucuri, Colombia. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 10: 397-402.
27. HAMMON, W. M.; and T. H. Work. 1964. Arbovirus infection in man, In; Lennette E. H. and N. J. Shmidt (eds)., Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases. New York, American Public Health Asso-

- ciation. pp. 268-311.
28. HURTS, E. W. 1936. Infection of the Rhesus monkey (Macaca mulatta) and the guinea pig with the virus of equine encephalomyelitis. Journal of Pathology and Bacteriology. 42: 271.
29. JOHNSON'S R. T. 1964. The pathogenesis of herpes virus encephalitis I Virus pathways to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody staining. Journal of Experimental Medicine. 119: 343.
30. KISSLING, R. E.; R. N. Chamberlain.; D. B. Nelson.; D. D. Stam. 1956. Venezuelan equine encephalomyelitis in the horse. American Journal and Hygiene. 63: 274-287.
31. KLIMENKO, S. M.; F. I. Yershov.; A. P. Gorman.; Navatnikov and V. M. Zhdanov. 1965. Architecture of Venezuelan equine encephalitis virus. Virology. 27: 125-123.
32. KOPROWSKI, H.; and H. R. Cox. 1947. Human laboratory infection with Venezuelan equine encephalomyelitis virus report of 4 cases. New England Journal of Medicine. 236: 647-654.

33. KUBES, V.; and F. A. Rios. 1939. The causative agent of infections equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science*. 90: 20-21.
34. _____, 1944. Venezuelan type equine encephalomyelitis virus in Trinidad. *Science*. 99: 41-42.
35. _____, and F. Galia. 1944. Neutralización del virus encefalomiélico equino tipo Venezuela por sueros humanos. *Gaceta Médica de Caracas* 52: 89-95.
36. _____, and C. Del Aguila B. 1969. An outbreak of equine encephalomyelitis in Guatemala, 1969. Isolation of the agent. *Revista Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Guatemala*. 2 (4) : 57-62.
37. KUNDIN, W. D.; C. LIU.; P. HISELL.; and S. Hamachize. 1963. Studies on West Nile virus infections by means of fluorescent antibodies. I Pathogenesis of West Nile virus infections in experimentally inoculated suckling mice. *Archiv for die Gesante Virus Forschung*. 12: 514.
38. _____, and Liu Chien and Patricia Rodina. 1966. Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Infection in suckling mice. *The Journal of Immunology*. 96 (1): 39-48.

39. KUNIN, C. M.; 1962. Virus tissue union and the pathogenesis of enterovirus infections. *Journal Immunology*. 88: 556.
40. LEVI-CASTILLO, R. 1952. The problem of human and equine encephalomyelitis in Ecuador. *Acta Tropical*. 9: 77-80.
41. MALKOVA, D.; 1960. Participation of the lymphatic and blood circulation in the disseminations of tick-borne encephalitis virus to the organs of experimentally infected mice. *Acta Virol*. 4: 290.
42. MEDINA, G.; C. A. Gleiser, and R. B. Mackenzie. 1965. Brote de encefalomiелitis equina en la República de Panamá. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 68 (5): 390-394.
43. MILLER, M. E. and W. F. Sherer. 1968. Venezuelan encephalitis viremia in hamsters and its relations to virus feedback from sentinel hamsters to mosquitos in nature. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 17: 776-780.
44. MINS, C. A.; 1964. Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bacteriological Rev*. 28: 30.

45. MORILLA-GONZALEZ, A., J. De Mucha Macías. 1969. An epidemic of Venezuelan equine encephalomyelitis in Tamaulipas, Mexico. *Revista Investigación Salud Pública Mexicana*. 29: 3-20.
46. MUCHA MACIAS, J. DE.; I Sánchez-Spindola and Carlos Campillo-Sainz. 1966. Venezuelan equine encephalitis antibodies in human beings of southeastern Mexico. *American Journal of Tropical and Hygiene*. 15: 364-368.
47. _____, and A. Morilla González. 1967. Venezuelan equine encephalomyelitis. Study of a virus strain isolated in Mexico. *Revista de Investigación Salud Pública Mexico*. 27: 35-110.
48. NUSSGAY, M.; and J. Weibel. 1962. Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in K. B. cells. *Virology*. 16: 52-62.
49. _____, and J. Weibel. 1963. Electron microscopic demonstration of purified Venezuelan encephalitis virus. *Virology*. 9: 109-112.
50. PERALTA, P. H.; and A. Shelakov. 1966. Isolation and characterization of arboviruses from Almirante, Republic of Panamá. *American Journal Tropical Me-*

dicine and Hygiene. 15: 369-378.

51. REED, L. J.; and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. Journal of Hygiene. 27: 483.
52. ROBERTS, E. D.; Carlos Sanmartin.; Jaime Payán.; and R. B. Mackenzie. 1970. Neurophatologic changes in 15 horses with naturally occurring Venezuelan equine encephalitis. American Journal Veterinary Research. 31 (7): 1223-1229.
53. ROBINS, S. 1969. Tratado de Patología 3ed. México, Interamericana. 1332 p.
54. RUGIERO, H. R.; H. S. Parodi.; and A. C. Saenz. 1948. Meningo encefalitis equine Venezolana en el hombre. Revista Institute Malbran. 13: 154-162.
55. SANMARTIN-BARBERI C.; H. Groot.; and E. Osorno Mesa. 1954. Human epidemic in Colombia caused by Venezuelan equine encephalomyelitis virus. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 3: 283-293.
56. SCHERER, W. F.; R. W. Dickerman.; C. Wong Chia.; A. Ventura.; A. Moorhouse.; R. Geiger.; and A. Diaz Nagera. 1964. Venezuelan equine encephalitis virus in Veracruz, Mexico, and the use of hamster as senti-

- nels. Science. 145: 274-275.
57. SELLERS, R. F.; G. H. Bergold.; O. M. Suarez and A. Morales. 1965. Investigations during the Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuelan 1962-1964. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 14: 460-469.
58. SHOPE, R. E.; R. Causey.; A. H. Paez de Andrade.; and M. Theiller. 1964. The Venezuelan equine encephalomyelitis complex of group A. Arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazona region of Brazil. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 13: 723-727.
59. SMITH, D. G.; H. K. Mamay.; R. C. Marshal.; and J. C. Wagner. 1956. Venezuelan equine encephalomyelitis laboratory aspects of fourteen human cases following vaccination and attempts to isolate the virus from the vaccine. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 63: 150-164.
60. SOTOMAYOR, C. G. 1946. A study of the virus of equine encephalomyelitis in Ecuador. Journal American Veterinary Medicine Association. 109: 478-480.

61. SORIANO, L. A.; and L. Figueroa. 1942. Aislamiento de un virus de un caballo atacado de "peste loca" en Bogotá. Boletín Instituto Nacional de Higiene, Samper Martínez. 8: 3-15.
62. SUTTON, L. S.; and C. C. Brooke. 1954. Venezuelan equine encephalomyelitis due to vaccination in man. Journal American Medical Association. 55: 1473-1476.
63. TASKER, J. B.; M. L. Miesse., and T. O. Berge. 1962. Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis III Distribution in tissue of experimentally infected mice. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 11: 844-850.
64. TIGERTT, N. D.; T. O. Berge.; and N. G. Downs. 1962. Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis in Trinidad. W. I. I. Serological studies of human beings. 1954-1958. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 11: 835-840.
65. VICTOR, J.; D. G. Smith.; and A. D. Pollack. 1966. Comparative pathology of Venezuelan equine encephalomyelitis. Journal Infection Diseases. 98: 55-66.

66. VILLA, L. J.; C. Blind and A. E. M. Vega. 1959. Aislamiento del virus de la encefalomiелitis equina (tipo Venezolano) Revista de Investigación Ganadera. 6: 121-122.
67. WORK, T. H. 1964. Serological evidence of arbovirus infection in the Seminole Indians in Southern Florida. Science. 145: 270-272.
68. WACHTER, R. F.; and E. W. Johnson. 1962. Lipid content of the equine encephalitis viruses. Federation Proceedings. 21: 461.
69. WEBB, H. E.; and C. E. G. Smith. 1966. Relation of immune response to development of central nervous system lesions in virus infections of man. British Medical Journal. 2: 1179.