

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD SILVESTRE DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN EQUIDOS Y BOVINOS EN LA PARROQUIA SARARE, ESTADO LARA, VENEZUELA, 2010

Detection of the Wild Activity of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus in Equids and Bovines at Sarare Parish, Lara State, 2010

Carlos Cova-Eregua¹, Ortelio Mosquera² y Gladis Medina³

¹Médico Veterinario de Ejercicio Libre de la Profesión. ²Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Ciencias Veterinarias. Unidad de Epidemiología. ³Investigadora Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIA. ortelimosquera@ucla.edu.ve

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad silvestre del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV), en équidos y bovinos de la parroquia Sarare, municipio Simón Planas del estado Lara, Venezuela en el año 2010. Se analizaron serológicamente 258 sueros de bovinos, utilizando la técnica ELISA, de los cuales solo un 8,1% resultaron seropositivos, mientras que por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) se encontraron 47,7% seropositivos. De igual forma se analizaron 111 sueros de équidos, un 62,2% fueron seropositivos mediante la prueba ELISA, y con la prueba IH hubo un 59,5% de sueros positivos. Para demostrar la asociación de las variables sexo con la presencia de anticuerpos de EEV en bovinos, la prueba de Ji-cuadrado no encontró diferencia significativa ($P>0,05$) mientras la prueba t de student determinó que la presencia de anticuerpos difirió en cuanto a la edad, siendo los bovinos de 6 a 12 meses y los équidos mayores a 48 meses donde se encontró el mayor porcentaje de positivos al virus EEV, para ambas técnicas de diagnóstico. Con respecto a la concordancia entre las técnicas IH y ELISA se utilizó el índice Kappa encontrando una concordancia buena entre estas técnicas en la detección de anticuerpos de EEV en équidos. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de actividad viral silvestre en un periodo no mayor de 2 años así como la presencia de un foco enzoótico en la zona.

Palabras clave: Zoonosis, ELISA de bloqueo, inhibición de la hemoaglutinación, encefalitis equina venezolana.

ABSTRACT

The objective of this work was to diagnosis by serology the wild activity of the Venezuelan Equine Encephalitic (VEE) virus in equids and bovinos at Sarare Parish, Simon Planas County, Lara State, Venezuela in 2010. Two hundred fifty eight bovine sera samples were analyzed through an immune enzymatic test (ELISA), and only the 8.1% of those sera were seropositive, whereas, 47.7% sera samples were seropositive using the Hemoagglutination Inhibition Test (HIT). In addition, 111 equine sera were also analyzed by the ELISA test, and 62.2% were seropositive by this technique, whereas 59.5% of these sera were seropositive by the HIT. To demonstrate the association of the variables of sex and the presence of VEE antibodies in cattle, through Chi-square test, $P>0.05$ to sex was not detected significant difference, while the Student t test found that ages differ in the presence of antibodies, cattle for more than 48 months old and equids of 6-12 months of age were the groups at highest proportion of positive VEE virus both diagnostic techniques. Regarding the agreement between ELISA and HIT, Kappa test was used to find good agreement between these techniques in detecting antibodies in horses. In conclusion, the results showed the possibility of wild activity of the VEE virus in a lapse no longer than two years, plus the existence of a zoonotic phocus of this disease in the studied area.

Keywords: Zoonosis, ELISA, hemagglutination inhibition test, venezuelan equine encephalitis.

INTRODUCCIÓN

La Encefalitis Equina Venezolana (EEV) es una enfermedad infecciosa de etiología viral, de carácter zoonótico, que

afecta a équidos (*Equus caballus* y *Equus asinus*) y humanos, no contagiosa, aguda; transmitida por la picadura de mosquitos hematófagos [15]. El virus de la EEV pertenece a la familia *Togaviridae* genero *alfavirus* y está subdividido en seis subtipos: el subtipo I tiene 5 variantes antigénicas AB, C, D, E y F; el subtipo III tiene tres variantes antigénicas A, B y C [1, 7].

Del subtipo I, las variantes AB y C (cepas epizoóticas, equicidas), son las responsables de las epizoótias en los équidos [1]. El resto de las variantes del subtipo: ID, IE e IF así como los subtipos II, III, IV, V y VI no afectan a los équidos y les confieren inmunidad contra las cepas epizoóticas [19].

Todos los subtipos afectan y producen enfermedad en el hombre. La enfermedad producida por el virus de la EEV en los équidos se presenta en forma explosiva, recurrente y estacional, asociada con un aumento en las precipitaciones pluviales mayores a las habituales en ambientes de maleza desértica y semidesértica [11, 23].

La presencia de arbovirus está limitada por las condiciones geográficas o climáticas que determinan la distribución de los vectores, hospedadores, reservorios y los agentes causales. En países americanos se emplea como método de caracterización básico el sistema de clasificación de formaciones vegetales o zonas de vida de Holdridge, el cual permite identificar las diferentes regiones que son favorables para el desarrollo de cepas enzoóticas y epizoóticas [4, 14, 16].

Para la prevención de la EEV en équidos, existe una vacuna preparada a partir de una cepa del virus, modificado en cultivos celulares, Tissue Culture, Strain 83 (TC83), en cultivo primario de corazón de cobayo fetal, que ha demostrado una alta eficacia para protegerlos [3].

En los bovinos (*Bos taurus*, *Bos indicus*) la infección al virus de la EEV no se manifiesta en forma clínica, en áreas donde se vacuna a los équidos.

En investigaciones experimentales se ha demostrado que los bovinos poseen anticuerpos (Ac) Inhibidores de la Hemaglutinación (IH) y Neutralizantes (SN) para el virus de la EEV [21].

Se ha sugerido que los bovinos pueden servir como animales centinelas para detectar la actividad viral en un área [24].

En otros estudios experimentales, inoculando bovinos con la cepa TC83 fueron utilizados 51 bovinos menores de dos años y 27 mayores de dos años, de los cuales 52,94 y 62,96%, respectivamente, resultaron positivos mediante la prueba IH, no encontrando diferencia significativa entre los grupos de edad, considerándose positivo cuando inhibe la haemaglutinina a dilución de 1:40 [9].

En una encuesta serológica realizada en una área enzoótica a EEV de México, en 58 bovinos mayores de dos años y 27 mayores de dos años, de diferente sexo se encontraron títulos elevados, independientemente de la edad y del sexo [2].

En Venezuela se han realizado estudios serológicos en bovinos menores de 12 meses de nacidos, en los municipios San Juan de los callos, Capadare y la Pastora del estado Falcón obteniéndose un resultado del 7 al 10%, mientras en el municipio Juan José Mora del estado Carabobo, la positividad obtenida fue del 8,9%. La correlación entre el estado inmunitario de équidos y bovinos permiten conocer el riesgo de infección en la población susceptible [12].

En una población de 1.380 équidos pertenecientes a los municipios Mara, Almirante Padilla, Páez, Miranda y Santa Rita del estado Zulia, se encontró un grado de inmunidad de 38,6% contra el virus de EEV mediante la técnica (ELISA). La vacuna utilizada contra el virus de EEV no generó títulos detectables de AcN en la población de équidos del municipio Miranda, analizada en este estudio. La presencia de équidos no vacunados con anticuerpos en los municipios Mara y Páez sugiere inmunidad natural previa o fallas en el registro de vacunación. Con respecto a la edad se encontró que, los équidos a mayor edad tienen más oportunidad de adquirir inmunidad contra el virus. No se encontró diferencia significativa entre el sexo y la especie [22].

Con la finalidad de conocer el estado inmunológico de la población de équidos de los distritos Mara y Páez de la Guajira Venezolana, en relación al virus de EEV, fueron obtenidas muestras de sangre de 236 équidos. El 53% mostró títulos mayores de 1:20 y menores de 1:640, mediante la prueba IH, demostrándose que para ese año, el 53% de la población de équidos presentaba Ac contra EEV [20].

También en el estado Zulia, en un estudio realizado en équidos mediante la técnica IH se obtuvo una prevalencia del 51.2% y se detectaron Ac en bovinos menores de 12 meses con títulos que oscilaron entre 1:40 y 1:320 en la parroquia Encontrados, considerando que estos animales nunca son vacunados contra el virus de EEV y eran animales menores de 12 meses, lo cual sugiere que, los Ac presentes se debían a exposición, en forma natural con el virus y de actividad reciente. La demostración de anticuerpos SN en los bovinos reflejan que el virus de EEV estuvo circulando en esas localidades, sin embargo, no hubo señales de enfermedad en équidos ni en humanos durante el estudio [13].

Para el diagnóstico de laboratorio se realizaron técnicas serológicas, tales como la prueba de IH y ELISA, para detectar Ac contra el virus, teniendo en cuenta que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de Ac específicos [6].

El objetivo de este trabajo fue demostrar actividad viral silvestre a través de la detección de Ac séricos contra el virus de la EEV usando la técnica estándar IH, así como la técnica Elisa. De igual modo se pretende con este estudio realizar comparaciones de los métodos de detección de Ac entre IH y ELISA en las especies de équidos y bovinos de la parroquia Sarare, municipio Simón Planas del estado Lara, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se enmarca dentro de la modalidad de investigación tipo Transversal Descriptivo [18].

El área de estudio estuvo situada en los sectores de la parroquia Sarare, municipio Simón Planas del estado Lara, específicamente ubicado, al sur del Estado, entre 09° 40'45" y 10° 02'35" de LN y los 68° 48'14" y 69° 16' 52" de LO. Limita por el norte con el municipio Palavecino, estado Lara y estado Yaracuy; por el sur con el estado Portuguesa; por el este con el estado Yaracuy y estado Cojedes, por el oeste con el municipio Iribarren y el estado Portuguesa. Las lluvias estacionales son aproximadas a 1400 mm³/año, la temperatura promedio anual es 26,8°C y la altitud es de 500 a 1000 msnm. Con respecto a la vegetación, se encuentran especies arbóreas que crecen a orillas de los ríos y bosques que corresponden a los tipos secos y sabanas tipo tropófilas como en la mayoría de los ecosistemas de sabanas de Venezuela [8].

Los sectores de estudio estuvieron conformados por veinticuatro predios de la parroquia Sarare, en bovinos doble propósito y de raza lechera con una población de 4.790 bovinos en edad de uno hasta los 24 meses y 176 équidos de dos a cinco años [10].

Para determinar el valor de la muestra se utilizó la fórmula para el cálculo de una muestra en poblaciones infinitas [17] logrando que en el desarrollo de la investigación se utilicen eficientemente los recursos disponibles y los resultados obtenidos tuvieran validez científica.

$$N = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{e^2}$$

donde:

N = tamaño de la muestra

Z² = valor determinado por el nivel de confianza asumido por el muestreo de 95%

p = prevalencia estimada 0,50

q = no prevalencia 0,50

e² = error de muestreo de 5%

Sustituyendo se tiene:

$$N = \frac{(1,96)^2 \cdot (0,50)(0,50)}{(0,05)^2} = \frac{3,84 \cdot 0,50 \cdot 0,50}{0,0025} = \frac{0,9604}{0,0025} = 384 \text{ Muestras}$$

En esta investigación se aplicó como procedimiento estadístico el muestreo aleatorio y sistemático de las fincas con criterios de inclusión en los animales (edad y que fueran autóctonos de la zona).

Las 384 muestras seleccionadas fueron distribuidas, 70% en bovinos y 30% en équidos, tomando en consideración el propósito del trabajo.

Posteriormente se procedió a recolectar 10 mL de sangre de la vena yugular de los équidos en edad de cuatro meses hasta cinco años y bovinos autóctonos en edad comprendida de cuatro hasta 24 meses, depositada en tubos Vacutainer^R sin anticoagulante, dejándolos en reposo en forma inclinada durante dos horas en su respectiva gradilla para la retracción del coágulo y liberación del suero. Las muestras identificadas se colocaron en una cava con hielo de agua y llevados al laboratorio de Microbiología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Una vez que se obtuvo el retraimiento del coagulo sanguíneo se centrifugaron por 10 minutos para terminar de separar el suero del coagulo sanguíneo en una centrifuga (modelo PR 12, marca International equipment Co., Philadelphia, EUA). Luego el suero fue trasvasado en viales de 3 µL y trasladados al laboratorio de Arbovirus del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Maracay) donde fueron almacenados a -20°C en un congelador modelo AFB601 marca Whirlpool (Whirlpool Inc. EUA) hasta su procesamiento.

Prueba de ELISA

Consistió en detectar Ac presentes en los sueros problemas y fue ejecutada utilizando el protocolo específico [21]. Utilizando el lector de ELISA marca *Thermo Electron Corporation* (Ohio, EUA) Con un filtro de 405 nm, se tomaron las lecturas de la microplaca obteniendo los resultados en densidad óptica con la siguiente ecuación:

$$PI\ 100 = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra} \times 100}{\text{Densidad óptica promedio del control del conjugado}}$$

Cuando el porcentaje de inhibición de una muestra fue <30% se consideró como una muestra negativa y si fue ≥30, dicha muestra se consideró positiva.

Prueba IH

Para determinar la presencia de Ac IH en los sueros de los équidos y bovinos incluidos en la encuesta serológica se siguió la técnica descrita [5].

Se fundamentó en la capacidad que tiene el virus de la EEV de hemoaglutinar los glóbulos rojos de aves y algunos mamíferos a un pH y temperatura adecuados. El antígeno hemoaglutinante del virus de EEV (Hemoaglutinina) actúa como puente entre el receptor del eritrocito y el virus, causando ésta la hemoaglutinación. Esta capacidad se pierde al formarse el complejo antígeno-anticuerpo. Los resultados de esta prueba tienen la siguiente interpretación [9].

- Títulos IH iguales o mayores a 1/80 en animales no vacunados, es señal de actividad viral relativamente reciente o por contacto viral en época no muy lejana.
- Por efecto de la vacunación con vacunas a virus modificado se pueden detectar títulos IH entre 1/20 y $\geq 1/640$, según experiencias de laboratorio.
- La diferencia de títulos entre la fase aguda y la convaleciente establece el diagnóstico de la enfermedad.
- Respuestas negativas en animales en contacto con otros enfermos, precisan una segunda toma de sangre para verificar aparición de títulos de anticuerpos.
- Reducción de título IH por lo menos cuatro veces, mediante el tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol, establece que son anticuerpos de formación reciente.
- Títulos IH bajos (1/20) en animales no vacunados, pueden significar que hubo respuesta a contactos anteriores con cepas enzoóticas o epizoóticas, cruce con otros *alfavirus* o con una cepa perteneciente al complejo del virus EEV o EEE, alejada de la cepa del antígeno que se usa en la prueba [11].

Para establecer la concordancia entre las técnicas diagnósticas IH y ELISA se utilizó el índice Kappa [2], cuyos valores se establecen en la TABLA I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la FIG. 1 se observa que, a través de la técnica ELISA realizada en 258 bovinos, se detectaron 21 sueros positivos (8,1%) mientras que la técnica IH detectó 123 sueros positivos (47,7%). De acuerdo con Brito y col. [4], los AC presentes en los bovinos son producto de la respuesta del sistema inmune contra ellos cuando se exponen en el campo al virus de la EEV. En cuanto a la técnica IH, realizada en équidos mostró un resultado de 59,5% positivos, resultado similar al encontrado en una encuesta serológica realizada en 236 équidos de los distritos Mara y Páez de la Guajira Venezolana [20].

TABLA I
NIVELES DE CONCORDANCIA ENTRE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ACUERDO A LOS VALORES DEL ÍNDICE KAPPA

Valor de Kappa	Concordancia
Menos de cero	Ninguna
0,00 a 0,20	Mínima
0,21 a 0,40	Regular
0,41 a 0,60	Buena
0,61 a 0,80	Excelente
0,81 a 1,00	Casi perfecta

Fuente: Aquino y col. [2].

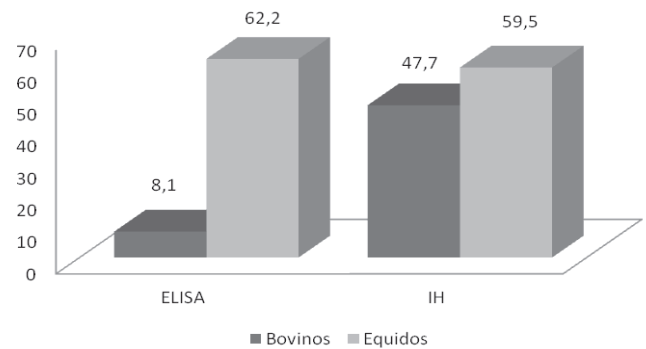


FIGURA 1. PORCENTAJE DE BOVINOS Y EQUIDOS POSITIVOS A EEV MEDIANTE LAS TÉCNICAS ELISA e IH, PARROQUIA SARARE, ESTADO LARA, VENEZUELA 2010.

En estudios realizados en el estado Zulia, Venezuela [13], utilizando la técnica IH, se obtuvo una prevalencia del 51,2% en équidos, sin encontrar diferencias entre sexo, mientras que en bovinos se obtuvieron títulos desde 1:40 a 1:320, resultados similares en este estudio, en cuanto a la proporción de positivos y sexo, a los encontrados en la parroquia Sarare, estado Lara ($P > 0,05$) (TABLA II).

Con respecto a la técnica ELISA en équidos se detectaron 69 sueros positivos (62,2%) y mediante la técnica de IH, 66 sueros positivos (59,46%). Al comparar este resultado, con los obtenidos por Valero y col. [22], quienes obtuvieron un valor del 38,6% de sueros positivos, resultado menor al obtenido en esta investigación, pero fue similar en cuanto no hubo diferencia de acuerdo con el sexo ($P > 0,05$).

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con la prueba IH en équidos, donde el mayor porcentaje de positividad se detectó en los mayores de dos años ($P < 0,05$) (TABLA III), este resultado difiere con los encontrados por Aquino y col. [2] al estudiar la región de Chiapas, México.

En relación a los resultados obtenidos en el municipio Urdaneta del estado Lara [13], utilizando la prueba de IH, donde se analizaron 175 sueros de équidos obteniéndose una seropositividad del (36,41%), difiere de los resultados de la presente investigación.

La TABLA IV, presenta los grupos etarios de los bovinos en estudio y mediante la prueba t de student, se demostró asociación entre la variable edad con la presencia de Ac al EEV, de acuerdo a las técnicas de IH y ELISA ($P < 0,05$), indicando que la presencia de Ac en bovinos tiene relación con la edad. Este resultado difiere al obtenido por Medina y col. [13].

Con respecto a la prueba IH en bovinos (TABLA V), aplicando la prueba Ji-cuadrado, la variable sexo demostró no ser significativa ($P > 0,05$) e independiente de la presencia de Ac, este resultado es similar al obtenido en una encuesta serológica realizada en México [2].

La TABLA VI muestra la concordancia entre las técnicas de diagnóstico ELISA e IH, para detectar la presencia de Ac

TABLA II
PORCENTAJE DE EQUIDOS POSITIVOS A LA PRUEBA ELISA e IH DE ACUERDO CON EL SEXO,
PARROQUIA SARARE, ESTADO LARA. VENEZUELA 2010

Edad (meses)	Número Muestras	%	Positivas a IH	%	Positivas a ELISA	%
Macho	54	48,6	33	50	33	47,8
Hembra	57	51,4	33	40	36	52,2
Total	111	100,0	66	100	69	100,0

P>0,05

TABLA III
PORCENTAJE DE ÉQUIDOS POSITIVOS A LA PRUEBA ELISA e IH DE ACUERDO CON LA EDAD.
PARROQUIA SARARE, ESTADO LARA. VENEZUELA. 2010

Edad (meses)	Número Muestras	%	Positivas a IH	%	Positivas a ELISA	%
6-12	7	6	1	1,5	3	4,3
13-14	11	10	3	4,5	3	4,3
25-36	11	10	4	6,0	5	7,2
37-48	30	27	11	16,7	11	15,9
>48	52	47	47	71,3	47	68,3
Total	111	100	66	100,0	69	100,0

Estadísticamente significativo (P<0,05).

TABLA IV
PORCENTAJE DE BOVINOS POSITIVOS A LA PRUEBA ELISA e IH DE ACUERDO CON LA EDAD.
PARROQUIA SARARE, ESTADO LARA. VENEZUELA 2010

Edad (meses)	Número Muestras	%	Positivas a IH	%	Positivas a ELISA	%
6-12	201	79	103	84	13	62
13-14	36	13	10	8	3	14
19-24	13	5	7	6	4	19
25-48	8	3	3	2	1	5
Total	258	100	123	100,0	21	100

Estadísticamente significativo (P<0,05).

TABLA V
PORCENTAJE DE BOVINOS POSITIVOS A LA PRUEBA ELISA e IH DE ACUERDO CON EL SEXO.
PARROQUIA SARARE, ESTADO LARA. VENEZUELA 2010

Edad (meses)	Número Muestras	%	Positivas a IH	%	Positivas a ELISA	%
Macho	135	52	66	53,7	9	42,9
Hembra	123	48	57	46,3	12	57,1
Total	258	100	123	100,0	21	100,0

P>0,05.

TABLA VI
CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS ELISA e IH,
MEDIANTE EL INDICE KAPPA. PARROQUIA SARARE.
ESTADO LARA, VENEZUELA 2010.

Especie	Kappa	Concordancia
Bovinos	-0,650	Ninguna
Équidos	0,603	Buena

contra EEV en bovinos y equinos, utilizándose el índice Kappa determinando que para el comportamiento de las pruebas en los bovinos no hubo concordancia, mientras que en la detección de anticuerpos presentes en los équidos, la concordancia entre las técnicas fue buena de acuerdo a los valores establecidos (TABLA I).

CONCLUSIONES

La presencia de anticuerpos en los sueros de bovinos analizados por las técnicas ELISA (8,14%) e IH (47,67%) demostró baja difusión de la actividad viral en los sectores de la parroquia Sarare, con posibilidad de existencia de un foco enzoótico, en función de los resultados obtenidos y del ecosistema observado en la zona, así como posibles vectores y reservorios. Este resultado confirma la necesidad de tomar medidas preventivas ante la posibilidad de presentación de casos en la Parroquia.

Los anticuerpos encontrados en los équidos por ambas técnicas son producto de la vacunación realizada por el Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) Sarare con la vacuna TC83, aplicada anualmente a través del Programa de Prevención y Control de la EEV. Los équidos diagnosticados serológicamente negativos, en ambas técnicas de diagnóstico, se encuentran susceptibles a la enfermedad, representando un riesgo epidemiológico a la población humana y de équidos de la Parroquia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACHA, P.; SZYFRES, B. Encefalitis Equina Venezolana. 3^{ra} Ed. Publicación Científica. **Organización Panamericana de la Salud**. N° 580. Pp 94-106. 2003.
- [2] AQUINO, M.; CAMPALLA, D.; MORILLA, A. **Encefalitis Equina por Arbovirus**. Encuestas serológicas Inst Nac de Investig Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. 26 pp. 1999.
- [3] BERGE, T.; TIGERTT, W. Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea pig heart cells. **Am. J. Hyg.** 73:209-218. 1961.
- [4] BRITO, E.; REYES, E.; OLANO, V. Encefalitis Equina Venezolana. **Symposium Internacional de Salud Pública Veterinaria**. Inst. Colomb. Agrop. Bogotá, 06/12-14, Colombia. Pp 165-169. 2003.
- [5] BYKOVSKY, A.; YERSHOV, F.; ZHDANOV, V. Morphogenesis of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 4: 496-504. 1969.
- [6] CLARKE, D.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 7:561-573. 1958.
- [7] FENNER, F.; BACHMUNN, P.; GIBBS, E. Togavirus y Flavivirus. **Virología Veterinaria**. Pp 451-470. 1987.
- [8] FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA REGIÓN CENTROCCIDENTAL. VENEZUELA (FUDECO). Atlas Municipio Simón Planas, estado Lara. Pp 26-27. 2003.
- [9] GALLO, M.; BAUTISTA, C.; ZARATE, M.; MORILLA, A. Evaluación de la respuesta serológica de los bovinos al virus EEV. **Bol. Of. Sanit Panam.** 86 (1):10-19. 1979.
- [10] INSTITUTO DE SALUD AGRÍCOLA INTEGRAL (INSAI-Lara). Censo de población bovina y equina. Parroquia Sarare, estado Lara. Informe Técnico. 15 pp. 2009.
- [11] JOHNSON, K.; MARTÍN, D. Encefalitis Equina Venezolana. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** 18:79. 1974.
- [12] MEDINA, G.; ESCOBAR, T.; BIANCHI, F.; TRUJILLO, A.; HERNÁNDEZ, V. Uso de bóvidos jóvenes para la detección de actividad de los virus de Encefalitis Equinas. 2004. **Med. Vet. al día**. En línea: <http://www.medicinaveterinaria.com.ve>. 24/11/2010.
- [13] MEDINA, G.; SALAS, R.; SIEGER, J.; JAIMES, E., Virus de Encefalitis Equina Venezolana. **Vet. Trop.** 25 (1): 41-61. 2000.
- [14] MESA, F.; CARDENAS, J.; VILLASMIL, L. Ecología. **Las Encefalitis Equinas en Salud Pública**. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 123 pp. 2005.
- [15] MURRAY, P.; ROBAYASHI, G.; FELLER, M.; ROSENTHAL, K. Togavirus **Medicina Microbiol.** Ed. Internacional, Londres. Pp 651-655. 1994.
- [16] NAVARRO, R.; FLORES, A.; VILLARREAL, C.; MENDEZ, M.; FRAIRE, M. Estudio epidemiológico para determinar la presencia de virus endémico de encefalitis equina venezolana (EEV) en seis zonas bióticas del estado de Chiapas-México. **Taller- Seminario sobre Encefalitis Equina Venezolana**. Maracaibo, 2-3 de Septiembre, Venezuela. 23 pp. 1997.
- [17] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Organización Mundial de la Salud (OMS). Procedimientos para Estudio de Prevalencia de Enfermedades Crónicas en el Ganado. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica N° 18. Buenos Aires. 35 pp. 1973.
- [18] PINEDA, E.; ALVARADO, E. Estudios descriptivos. **Metodología de la Investigación**. 3^{ra} Ed. Ofic. Panam. Sanit. Pp 39-84. 2008.

- [19] RODRÍGUEZ, S. Epidemiología del virus de la encefalitis de San Luis en la Amazonia brasileña y en el estado de Mato Grosso Sul. **Rev. Pan-Amazónica do Saúd.** Brasil. 1(1): 10. 2010.
- [20] RYDER, S.; PÉREZ, M.; ÁVILA, J.; BRICEÑO, A. Detección de anticuerpos al virus de la encefalitis equina venezolana en équidos de los Distritos Mara y Páez de la Guajira Venezolana: evaluación prevacunacional. **Invest. Clín.** 28 (4):181-195. 1987.
- [21] SUDIA, W.; FERNANDEZ, L.; NEWHASE, V.; SANZ, R.; ALISHER, CH. Venezuelan Equine. Encephalities Outbreak. **Am. J. Epid.** 101: 51-58. 2001.
- [22] VALERO, N.; LARREAL, Y.; ARIAS, J. Seroprevalencia de la Encefalitis Equina Venezolana en una Población de Équidos del estado Zulia. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIV (14):324-330. 2004.
- [23] VARGAS, D.; JAIME, J.; VERA, J.; Aspectos generales del virus de la encefalitis Equina Venezolana. **Rev. Orinoquia** 13 (1): 59-67. 2009.
- [24] WANG, E. Protocolo de la Encefalitis Equina venezolana. **J. Clin. Microbiol.** 44: 40-48. 2001.