

**BROTE DE ENCEFALOMIELITIS  
EQUINA VENEZOLANA (VEE)  
DURANTE LA FORMACION DEL LAGO  
BAYANO, EN PANAMA, 1977\***

DR. ABDIEL J. ADAMES\*\*  
DR. PAULINE H. PERALTA\*\*\*  
DR. ROLANDO SAENZ, APMC, FACP\*\*\*\*  
DR. CARL M. JOHNSON, APMC, FACP\*\*\*\*\*  
DR. PEDRO GALINDO, APMC\*\*\*\*\*

- 
- \* Parte de la información aquí presentada ha sido obtenida gracias al subsidio No. A1-02984, financiado por el Instituto de Alergia y Enfermedades Infecciosas del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos.
- \*\* Jefe del Departamento de Ecología, en el Laboratorio Conmemorativo Gorgas, Panamá, R.P.
- \*\*\* Investigadora del Departamento de Virología en el Laboratorio Conmemorativo Gorgas, Panamá, R.P.
- \*\*\*\* Investigador Médico del Departamento de Investigaciones Clínicas del Laboratorio Conmemorativo Gorgas, Panamá, R.P.
- \*\*\*\*\* Jefe del Departamento de Investigaciones Clínicas en el Laboratorio Conmemorativo Gorgas, Panamá, R.P.
- \*\*\*\*\* Director Emérito y Asesor del Laboratorio Conmemorativo Gorgas, Panamá, R.P.

BROTE DE ENCEFALOMIELITIS  
EQUINA VENEZOLANA (VEE)  
DURANTE LA FORMACION DEL LAGO  
BAYANO, EN PANAMA, 1977

BROTE DE ENCEFALOMIELITIS EQUINA VENEZOLANA (VEE)  
DURANTE LA FORMACION DEL LAGO BAYANO,  
EN PANAMA, 1977

Dr. Abdiel J. Adames  
Dr. Pauline H. Peralta  
Dr. Rolando Sáenz, APMC, FACP  
Dr. Carl M. Johnson, APMC, FCAP  
Dr. Pedro Galindo, APMC

Un brote de Encefalomiелitis Equina Venezuela (VEE) fue detectado durante la formación del lago artificial de Bayano en el año 1977, en la República de Panamá. El virus fue aislado de tres especies de mosquitos que viven asociados con la maleza acuática conocida como lechuga de agua (*Pistia stratiotes*), la cual proliferó abundantemente durante la formación del lago, al igual que las especies de mosquitos que viven asociados con ella. Los aislamientos fueron los siguientes: 1 de *Culex erraticus*, 1 de *Mansonia dyari*, 3 de *Culex ocosa*, (= *C. aikenii*), 24 de

"hamsters" centinelas y 9 de casos humanos cuyo diagnóstico se confirmó mediante el aislamiento del virus de la sangre.

#### Introducción:

Desde el año de 1972 el Laboratorio Conmemorativo Gorgas (LCG) realizó investigaciones biomédicas en la cuenca del Río Bayano, en el área en la que hoy se encuentra el lago Bayano. El principal proyecto de investigación consistió en el estudio sobre la ecología de los arbovirus antes, durante y después de la formación del lago Baya-

no, con el fin de detectar los efectos que tendría la formación del mencionado lago sobre estos virus en el área. Dicho proyecto de investigación se encuentra en sus etapas finales de realización y los resultados que aquí se exponen representan solamente un pequeño apéndice de la totalidad de los mismos.

La Encefalomiелitis Equina Venezolana (VEE) es un complejo de varios serotipos de virus divididos en 4 grupos en la forma siguiente (1): I. el prototipo de VEE; II. el prototipo de la cepa de la Florida; III. el prototipo del virus Mucambo; IV. el prototipo del virus Pixuna.

El prototipo I se subdivide igualmente en 5 subtipos: I-a, I-b, I-c, I-d y I-e, de los cuales I-d y I-e ocurren en Panamá. Ambos son patógenos para el hombre, pero inocuos para el caballo. El subtipo detectado y estudiado en Bayano corresponde al I-d. Este subtipo fue aislado por primera vez en Panamá del suero obtenido de un joven de 14 años procedente de Cañitas, una comunidad en el distrito de Chorrera, a orillas del Lago Gatún (2). Galindo (3) señala que estudios posteriores realizados por investigadores del Laboratorio Conmemorativo Gorgas han demostrado que el subtipo I-d ocurre en forma enzoótica en roedores silvestres y que el vector principal parece ser el

mosquito *Culex (Melanoconion) ocosa* Dyar y Knab (= *C. (M.) aikenii*). Las fases inmaduras de producción de este mosquito se desarrollan en asociación directa con la planta acuática conocida como la "lechuga de agua" (*Pistia stratiotes*) (4, 5).

La formación del Lago Bayano trajo consigo drásticas alteraciones en la ecología general del área de la cuenca hidrográfica del mismo nombre. Los resultados que se presentan en este artículo sobre la repentina aparición de VEE en diferentes componentes bióticos de la cuenca, incluyendo el hombre, se produjeron como resultado de estas drásticas alteraciones ambientales. Esta súbita aparición de un arbovirus se anticipaba como parte de la hipótesis general de trabajo del proyecto de investigación original.

## Material y métodos

### A. Descripción del área de estudio:

El Lago Bayano está situado a unos 90 Kms al noroeste de la ciudad de Panamá (Fig. No. 1) y es un depósito artificial formado el 16 de marzo de 1976 por el embalse del Río Bayano con el cierre de la represa hidroeléctrica. La cuenca del Río Bayano, que sirve la hidroeléctrica y al lago, tiene un área total de drenaje de 3,650 Km<sup>2</sup>. El lago tiene un área máxima de

350 Km<sup>2</sup>, una longitud de unos 60 Kms, una cota o altura máxima de 62 mts y una capacidad para almacenar de 5,000 x 10<sup>6</sup>m<sup>3</sup> de agua.

El área de embalse y de influencia del lago Bayano fue clasificada como Bosque Húmedo Tropical transicional a Bosque Seco Tropical (6). Según datos meteorológicos obtenidos por el Dr. Robert G. Read, del Laboratorio Conmemorativo Gorgas, desde 1973 hasta el presente, en lo que hoy es Isla Majé, la precipitación anual registrada supera en promedio a los 1,870 mm. La humedad relativa media anual registrada es de 88,4%. Los registros termométricos señalan una media de 27°C (máxima promedio, 30°C; mínima promedio, 23°C). El área de estudio se ubica, de acuerdo con Tosi (7), dentro del patrón de precipitación del Istmo como régimen Pacífico o Monzón, con una estación lluviosa prolongada, que se inicia en la segunda mitad del mes de abril y termina en la última parte de noviembre.

Desde las etapas iniciales de la formación del Lago Bayano proliferó en el mismo, de acuerdo con Candanedo (8), una gran variedad de malezas acuáticas. Entre abril de 1976 y diciembre de 1977 se observó la presencia de las siguientes especies: *Lemna minor* (lenteja de agua),

*Azolla caroliniense* (helecho de agua), *Pistia stratiotes* (lechuga de agua), *Spirodella polyrhiza* (lenteja de agua), *Ceratopteris pteridoides* (helecho de agua), *Heranthera reniformis* (lirio acuático), *Jussiaea* sp. (sauce de primavera), *Ceratophyllum* sp. (hierba de cuernos), *Cyperus* sp. (Parasol), *Typha angustifolia* (cola de gato), *Eleocharis intertenta* (maleza cabello), *Nimphaea* sp. (lirio acuático), *Limnobium stoloniferum* (hierba de rana), *Limnobium spongiae* (hierba de rana) *Paspalum* sp. (mijo de agua).

La lechuga de agua fue detectada por primera vez en el lago el 30 de abril de 1976; para fines de mayo de 1976 aproximadamente 20 hectáreas del lago estaban cubiertas por esta planta, diseminadas primordialmente en el sector conocido como Hoya de Majé (Figura No. 1) con un área total, a esa fecha, de unas 200 hectáreas.

En el área de Bayano residían en 1977 2,032 habitantes distribuidos en varias comunidades de indios Kunas y Chococs, como también de colonos caucásicos. Además de esas poblaciones, había un número variable de operadores de la presa y visitantes.

## B. Métodos de campo:

El área de estudio se estableció originalmente en las alturas



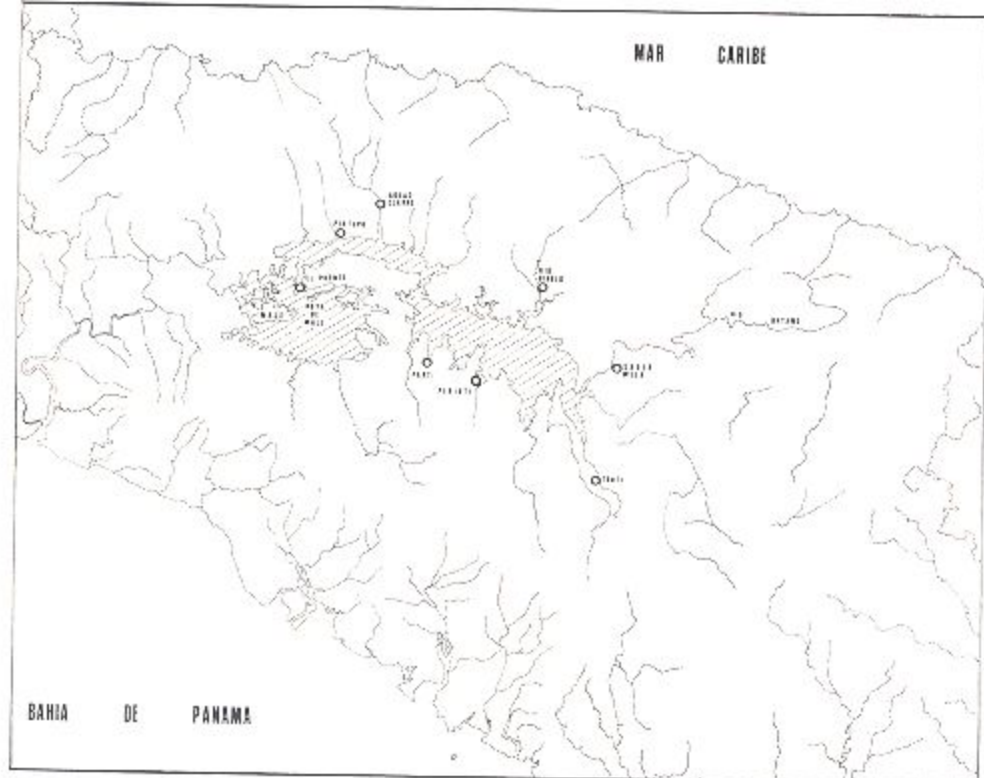


Fig. No. 1

Lago Bayano y sus Principales Comunidades



de Majé, lugar que después de la formación del lago constituye la isla del mismo nombre. En este lugar se construyeron torres para recoger en forma sistemática los insectos hematófagos. Las recolecciones se verificaron ininterrumpidamente desde enero de 1973 hasta diciembre de 1978; y se llevaban a cabo cada dos semanas, durante 24 horas continuas, utilizando un recogedor como cebo en una plataforma colocada en un árbol, a unos 26 mts. de altura; y otro, en la parte inferior del árbol, en el suelo del bosque. El material recogido se

congelaba en nitrógeno líquido, se anotaba la información correspondiente y se enviaba al Laboratorio Central de Panamá y luego al laboratorio de Virología, para su identificación correspondiente.

Para detectar igualmente los virus presentes en el área de estudio se instalaron los llamados animales centinelas, especialmente los topes o "hamsters". En el área de Majé, los "hamsters" se colocaban por períodos de un mes y eran alimentados e inspeccionados diariamente. El pro-

medio de "hamster" colocados por período era de 30. Aquellos animales que no se morían en el campo eran trasladados al laboratorio central para su observación y estudios serológicos posteriores. De aquellos que se enfermaban y morían se tomaban muestras de sangre, del corazón, riñones e hígado, del bazo y del cerebro. El material era congelado en nitrógeno líquido y se enviaba al laboratorio central para estudios virológicos.

Durante el año de 1977 también se expusieron cuatro "hamsters" centinelas en cada una de las 4 localidades indígenas de Pintupo, Aguas Claras, Río Diablo y de Sader Willa (Figura No. 1), situadas en el Lago Bayano.

Durante el período de formación del lago, los investigadores del LCG no realizaron visitas sistemáticas a las comunidades del Bayano para estudios biomédicos. Ocasionalmente, sin embargo, se verificaron giras médicas en las cuales se examinaban pacientes y se tomaban muestras de sangre, las cuales se congelaban en nitrógeno líquido y se enviaban al laboratorio central donde eran procesadas para estudios virológicos y serológicos. En el caso de pacientes febriles, de menos de 5 días de duración, se tomaba toda la información clínica y se obtenían muestras de sangre e hisopos faríngeos

para estudios de aislamiento de virus.

### C. Métodos virológicos:

Los aislamientos virológicos se hicieron en cultivos, en tubos de células VERO, por los métodos convencionales (9).

Para la determinación de anticuerpos en los sueros humanos también se utilizó la prueba de neutralización arriba mencionada.

Para la identificación de las cepas se utilizó la prueba de neutralización de placas (10), en combinación con la prueba de fijación del complemento (11).

## Resultados

### A. Aspectos Epidemiológicos:

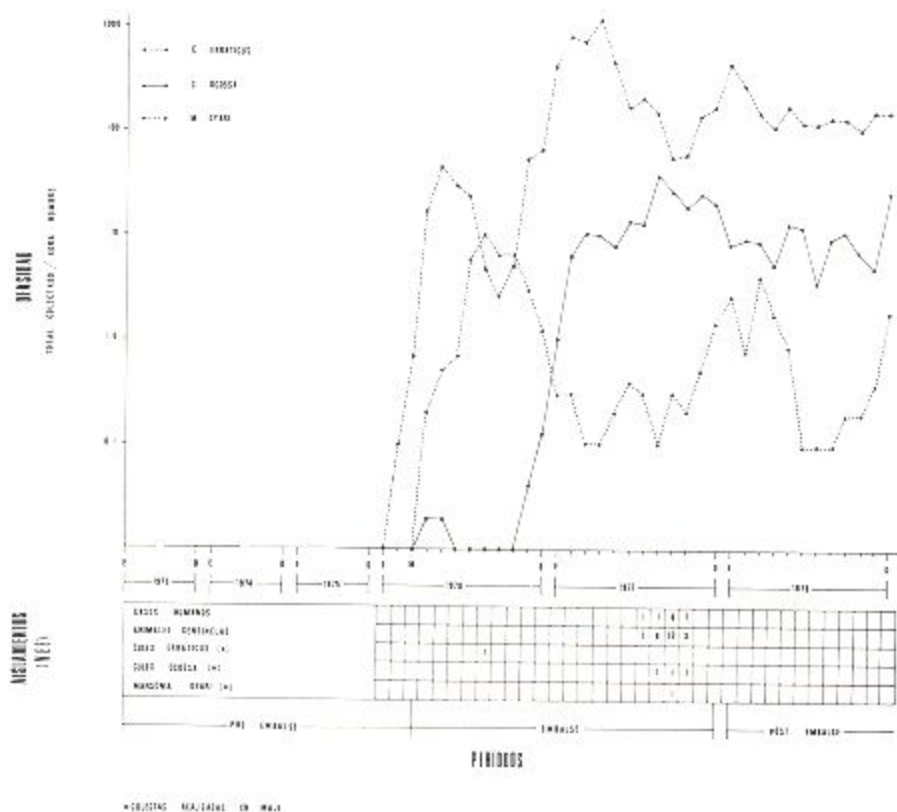
De acuerdo con los resultados presentados en la figura No.2, el virus de la VEE no fue detectado en los estudios realizados por el LCG hasta agosto de 1976. En la gráfica se puede apreciar igualmente que durante los años de 1973 a 1976 no se capturaron, en nuestras recolecciones en la Isla de Majé, los mosquitos *Culex (Melanoconion) erraticus*, *Culex (M.) ocosa* y *Mansonia (Mansonia) dyari*. El lago inició su formación el 16 de marzo de 1976; el 30 de abril de ese año se observó que la lechuga de agua proliferaba en el lago; en agosto de 1976 fue aislado el virus de la VEE por primera vez del mosquito *Culex erraticus*, que vive asociado con esta male-

za acuática. Posteriormente, el 3 de julio de 1977, cuando las masas de la lechuga de agua cubrían grandes extensiones del lago, el virus fue aislado en un "hamster" centinela (figura No.2), en la localidad Kuna de

en un paciente Kuna de 27 años, en la localidad de Pintupo (Cuadro No.1). El primer aislamiento del virus obtenido en mosquitos de la especie *Culex (M.) ocosa* se efectuó en especímenes capturados el 14 de

FIGURA No. 2

ASIAMIENTOS DE VEE EN DIFERENTES ELEMENTOS BIOTICOS DURANTE LA FORMACION DEL LAGO BAYANO



Sader Willa, en la parte superior del lago Bayano (figura No.1). El primer caso humano fue detectado el 23 de julio de 1977,

agosto de 1977. Obtuvimos 3 aislamientos de virus en estos mosquitos, uno en agosto, otro en septiembre y el último en



octubre, todos del material recogido en la Isla de Majé. En septiembre de 1978 se aisló el virus en otra especie de mosquito, que también vive asociado con la lechuga de agua, el *Mansonia dyari* (Fig. No.2). Los aislamientos de "hamsters" centinelas se iniciaron en Sader Willa, como lo indicamos anteriormente, el 3 de julio; posteriormente se realizaron 23 aislamientos en estos mismos animales, en la isla de Majé (Fig. No.2), así: 8 en agosto, 12 en septiembre y 3 en octubre.

El primer caso humano fue detectado por nosotros el 23 de julio de 1977, durante una de las visitas que hicimos para realizar estudios biomédicos en la comunidad de Pintupo. El segundo caso humano fue detectado por el personal médico del Centro Integrado de Salud de Chepo, en una gira médica realizada en la comunidad de Tortí, después que el LCG notificara a las autoridades del Ministerio sobre el primer caso de VEE en el Bayano. El tercer caso lo detectamos en un paciente que, durante una cacería, había tenido que pasar la noche a la intemperie en el área de Piriati. Se puede apreciar en el Cuadro No. 1 que en el período comprendido entre el 23 de julio y el 24 de octubre de 1977, se confirmaron 6 casos más. Todos fueron pacientes adultos, visitantes o residentes en el área del Bayano, y

sus edades oscilaron entre los 27 y los 50 años; siete eran del sexo masculino y dos del femenino. Tres adquirieron la infección en Piriati, dos en el Campamento del Laboratorio Conmemorativo Gorgas en la Isla de Majé, uno en Tortí Arriba, uno en la localidad del Puente Camilo Carles, uno en Aguas Claras y uno en Pintupo.

## B. Aspectos Clínicos:

El cuadro clínico que presentaron estos pacientes se caracterizó por su comienzo súbito con escalofríos, fiebre elevada, cefalea intensa y dolores osteomusculares generalizados. Algunos de los pacientes se quejaron de molestias faríngeas, de dolor retroocular, de náuseas y vómitos. En el examen físico destacó la marcada hiperemia conjuntival y faríngea. En ninguno de los casos se observó signos meníngeos ni encefalíticos. La evolución clínica ocurrió sin complicaciones y la sintomatología se prolongó, en la mayoría de los pacientes, por una semana. En dos pacientes se observó un curso clínico bifásico, con recrudescencia de los síntomas al sexto día de enfermedad. En tres pacientes se hicieron hemogramas diarios que revelaron, en las primeras 48 o 72 horas de enfermedad, una leucocitosis inicial con neutrofilia y luego, coincidiendo con la mejoría clínica, una leucopenia acen-

tuada con linfocitosis. En estos nueve pacientes el diagnóstico se confirmó mediante el aislamiento del virus en la sangre. En cuatro de estos nueve pacientes, de quienes se obtuvo sangre en la fase aguda y en la de convalecencia, se demostró la conversión serológica.

Una encuesta serológica realizada en la comunidad indígena de Piriati demostró; en este mismo período, evidencias de infección reciente en 17 de 21 casos con sueros pareados.

la Fig. No.2 el brote de VEE detectado en los nueve casos humanos mediante estudios virológicos, los 4 aislamientos de virus de mosquitos y los 24 aislamientos de virus de "hamsters" centinelas, ocurrieron en un plazo de 3 meses, aproximadamente 16 meses después del inicio de la formación del Lago Bayano y casi un año después de haber sido detectado el virus, por primera vez, en el mosquito *Culex erraticus*, recogido en esa área.

A pesar de que en el área (específicamente en Maié) el LCG

CUADRO No. 1

CASOS HUMANOS DE VEE DETECTADOS EN EL LAGO BAYANO  
EN JULIO - OCTUBRE 1977

CASO	FECHA	LOCALIDAD	EDAD DEL PACIENTE	SEXO	GRUPO ETNICO
1	23/VII/77	PISTUPO	27	M	KUNA
2	10/VIII/77	TORTI	28	M	CAUCASICO
3 *	4/IX/77	PIRIATI	31	M	CAUCASICO
4	9/IX/77	PIRIATI	50	M	CAUCASICO
5	24/IX/77	AGUAS CLARAS	45	M	KUNA
6 **	27/IX/77	PIRIATI	35	F	CHOCOE
7 **	28/IX/77	ISLA NATE	28	M	CAUCASICO
8	1/X/77	ISLA NATE	30	M	CAUCASICO
9	24/X/77	EL PUENTE	29	F	CHOCOE

\* Residente en la ciudad de Panamá.

\*\* Trabajadores del Laboratorio Conmemorativo Gorgas residentes en la ciudad de Panamá.

#### Comentarios:

De acuerdo con el resumen de los resultados presentados en

había realizado estudios sistemáticos desde 1973 para la detección de arbovirus, el virus de la

VEE fue aislado por primera vez en 1976 durante la primera fase de la formación del lago.

Cabe señalar que durante las investigaciones efectuadas el año 1974 por el LCG en la Cuenca del Bayano, se detectó la presencia de la "lechuga de agua" (*Pistia stratiotes*).

Durante la formación del depósito, factores aparentemente físico-químicos del agua favorecieron la proliferación de la planta, la cual ocupaba alrededor de 20 hectáreas del lago en formación para mayo de 1976, tal como habíamos indicado anteriormente. Con el desarrollo masivo de la planta proliferó, asociada con ella, una fauna de insectos hematofagos entre los que cabe destacar los mosquitos *Culex erraticus* (Dyar y Knab), *Culex ocosa* Dyar y Knab, *Mansonia dyari* Belkin, Heine- mann y Page, *Aedeomyia squamipennis* (Lynch Arribalza- ga) y el tábano *Lepiselaga cras- sipes* (Fabricius). Para agosto de 1976, de acuerdo con nuestros resultados (Fig. No.2), el *Culex erraticus* alcanzó un nivel máximo de población y fue durante ese período cuando se aisló el virus de la VEE en ese mosquito. Al aumentar las poblaciones de *C. erraticus* las posibilidades de que miembros de esta especie se infectaran con el virus de un ciclo *C. ocosa*-roedores-*C. ocosa* posiblemente existentes, fueron mucho mayores; eso per-

mitió el aislamiento del virus en un grupo de especímenes en nuestros estudios. No se logró aislar el virus de *C. erraticus* posteriormente; las razones para esta negatividad pueden inferirse posiblemente de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, los cuales nos indican que ese mosquito es un pobre vector del virus (12).

En julio de 1977 el virus hizo su reaparición súbita en los estudios, cuando el lago tenía 16 meses de formación y la proliferación de la lechuga de agua era mucho más acentuada. Las poblaciones de *Culex ocosa* eran más abundantes, a juzgar por los resultados obtenidos en la Isla de Majé (Fig. No.2). Secuencialmente se lograron aislamientos del virus de animales centinelas y de mosquitos; y se detectaron casos humanos en todo el lago Bayano, al comparar los resultados del Cuadro No.1 con la Fig. No.1. En septiembre se logró aislar el virus del mosquito *Mansonia dyari*, que también vive asociado con la lechuga de agua y que después de la formación del lago alcanzó niveles de población relativamente altos, tal como se puede apreciar en la Fig. No.2. Se desconoce la importancia de esta especie como vectora del virus VEE, aunque al aislamiento logrado en un grupo de especímenes puede dársele la misma interpretación mencionada anteriormente sobre



el aislamiento en *Culex erraticus* en 1976. Es necesario destacar que los aislamientos en mosquitos sólo se realizaron de especímenes capturados en la Isla de Majé, ya que durante ese período era el único lugar de estudio en el área del lago, en donde se recogían mosquitos para tratar de aislar los virus.

Es importante señalar que los mosquitos *Culex ocosa* capturados eran recogidos en las estaciones situadas en el interior del bosque, a bastante distancia de los criadores, en la parte del lago que cubre la Isla de Majé. Este factor puede haber influido en el número de aislamientos obtenidos de mosquitos ocurridos en la Isla de Majé ya que, como se señaló con anterioridad, una de las características del comportamiento de la especie es su corto perímetro de vuelo y sus colonias tienden a permanecer cerca de sus lugares de crianza (5). En los "hamsters" centinelas se logró un sólo aislamiento en la localidad de Sader Willa, que está situada en la parte superior del Lago Bayano; y 23 más, en el área de la estación experimental en Isla de Majé. El alto índice de aislamientos en Majé se debió probablemente al efecto multiplicador del virus, que podía tener la presencia constante en las islas de alrededor de unos 30 "hamsters" centinelas en ese momento, permitiendo de este

modo la amplificación del virus por medio de estos animales, y su consecuente multiplicación en un número mayor de mosquitos vectores.

Haciendo un análisis del Cuadro No. 1 podemos apreciar que, de los nueve casos humanos detectados mediante el aislamiento del virus, 7 eran hombres y 2 eran mujeres y que la edad de los pacientes fluctuaba entre 27 y 50 años. La edad de los pacientes puede tener relación con el comportamiento conocido del mosquito vector (*Culex ocosa*), que es enteramente nocturno y además, tal como hemos señalado anteriormente, porque tiene un perímetro de vuelo marcadamente corto y no se aleja a gran distancia de sus lugares de crianza. De esto último se podría inferir que, durante el período nocturno, los niños y los juveniles estarían en sus moradas y comunidades no directamente expuestos a las picadas de mosquitos infectados; mientras que los adultos, por razones de un mayor desplazamiento en el área durante la noche, que es el período de actividad del vector, estuvieron más expuestos a los ataques del mismo.

Es importante indicar que la detección de casos durante el brote no correspondió a una campaña sistemática en busca de casos febriles en los habitantes



de las distintas comunidades del Lago Bayano.

Haciendo una interpretación de los resultados, a pesar de carecer de datos más concretos para apoyarla, inferimos que la "desaparición" del virus de VEE se debió a una posible disminución de hospederos vertebrados disponibles, ya que una parte de las poblaciones de las distintas especies pudieron quedar inmunes. Por otra parte, las poblaciones de estas especies tendieron a reestablecerse territorialmente entrando en un "equilibrio" de densidad de población, al tiempo que las alteraciones ecológicas originales disminuirían y los ciclos de transmisión del virus

podrían quedar circunscritos a focos enzoóticos en el área.

## SUMMARY

An outbreak of Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE) was detected in 1977 during the formation of the Bayano lake, Republic of Panama. The virus was isolated from 3 mosquito species that breed in water lettuce (*Pistia stratiotes*). As the lake was forming both *Pistia* and the mosquitoes associated with it proliferated abundantly. We made 38 VEE isolates, 1 from *Culex erraticus*, 1 from *Mansonia dyari*, 3 from *Culex ocosia* (= *C. aikenii*), 24 from sentinel hamsters, and 9 from viremic human cases.

## BIBLIOGRAFIA

1. Young NA, Johnson KM: Antigenic Variants of Venezuelan Equine Encephalitis Virus: Their Geographic Distribution and Epidemiologic Significance. *Am J Epidemiol* 89: 286-307, 1969
2. Johnson KM, Shelokov A, Peralta PH, Dammin GJ, Young NA: Recovery of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in Panama. A Fatal Case in Man. *Am J Trop Med Hyg* 17: 432-440, 1968
3. Galindo P: Los Arbovirus de Panama. *Rev Med Panamá* 3: 1-41, 1978
4. Adames AJ, Galindo P: Colonization of *Culex (Melanoconion) aikenii* (Aiken and Rowland, 1906) in Panama. *Mosq News* 32: 196-200, 1972
5. Galindo P, Adames AJ: Ecological Profile of *Culex (Melanoconion) aikenii* (Diptera: Culicidae), Vector of Endemic Venezuelan Encephalitis in Panama. *Environ Entomol* 2: 81-86, 1973
6. Holdrige LR, Budowski G: Report of an Ecological Survey of the Republic of Panama. *Caribbean Forester* 17: 92-110, 1956
7. Tosi J: Informe Técnico 2. FAO, FO: SE/PANG, 1971
8. Candanedo C: Lago Bayano: Formación, Manejo y Control. Mesa Redonda, Instituto de Recursos Hidráulicos y Electrificación, p 1-11, 1978
9. Schmidt NJ: Tissue Culture techniques for diagnostic virology, en *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*, ed por Lennette EH, Schmidt NJ, 4th ed, New York, Am Public Health Assoc, 1969, pp 179-204

10. Earley E, Peralta PH, Johnson KM: A plaque neutralization method for arboviruses. Proc Soc Exp Biol Med 125: 741-747, 1967
11. Sever JL: Application of microtechnique to viral serological investigations J Immunol 88: 320-329, 1962
12. Virology Section. Gorgas Memorial Laboratory 48th Annual Report, Fiscal Year 1976, 95th Congress, 1st Session, House Document No. 95-39, p 18