

# ESTUDIOS BIOLÓGICOS DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS DE SAN LUIS EN MAJE, BAYANO\* \*\*

Dra. Betsy E. Dutary\*\*\*, Dra. Pauline H. Peralta\*\*\*\*,  
Dr. John L. Petersen\*\*\*\*\*

La presencia del virus de la Encefalitis de San Luis se ha observado periódicamente en el área del Bayano donde el LCG mantiene una vigilancia constante desde 1972. En este estudio informamos lo observado durante la estación lluviosa de 1983 y la estación seca de 1984. Veintiuno de los pollos centinelas expuestos, sero-convirtieron, no así las aves locales o migratorias examinadas. Se examinaron 25 especies de artrópodos diferentes, capturados por métodos diversos, y no se logró aislar el virus. Los estudio continúan.

El virus de la Encefalitis de San Luis (SLE) está ampliamente distribuido en las zonas templadas y tropicales de América. En la América tropical este virus se aisló por primera vez en Trinidad en 1955 (1) y en los años siguientes fue aislado en México,

Guatemala, Panamá, Jamaica, Trinidad, Surinam, Ecuador y Brasil (2). Los estudios serológicos realizados también han demostrado la presencia del virus SLE en el Caribe, en Centro y Sur América (2). Aunque la presencia del virus se conoce y los estudios efectuados incluyen a vertebrados y artrópodos, falta definir en detalle la ecología del virus SLE en el trópico.

El virus de la SLE ha sido aislado en Panamá de mosquitos de las especies *Haemagogus lucifer*, *Sabethes chloropterus*, *Deinocerites pseudus*, *Mansonia dyari* y *Culex nigripalpus* (3 a 5); de animales centinelas (pollos, ratones blancos y hámsteres) y también de aves locales (*Columbina talpacoti*) y de aves migratorias (*Phalacrocorax olivaceus*) (3,5,6). Los casos de la enfermedad en humanos, observados en Panamá, han

\* Presentado para publicación en mayo de 1984.

\*\* YARU - Este estudio es financiado en parte por el Contrato Yale University No. PO1 - A1 - 11132.

\*\*\* Jefe del Departamento de Arbovirología en el Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

\*\*\*\* Jefe de la División de Ciencias del LCG.

\*\*\*\*\* Jefe del Departamento de Genética de Insectos del LCG.

sido escasos y benignos (4), contrario a lo que ocurre en áreas templadas, como en Estados Unidos y en México, en donde el virus causa fiebre, escalofríos, cefalalgia, mialgias y vómitos; y en uno o dos días desarrolla una marcada somnolencia, frecuentemente acompañada de signos meníngeos. Los casos graves progresan hasta la confusión, parálisis, las convulsiones, coma y muerte. La población más afectada en las zonas templadas tiene 60 años o más (7) de edad.

El Laboratorio Commemorativo Gorgas (LCG) mantiene desde 1972, año en que se inició la construcción de la hidroeléctrica del Bayano, estudios tendientes a determinar la dinámica de la transmisión de arbovirus en esa área. Galindo y colaboradores describieron en esta Revista (3), las observaciones hechas desde 1972 y hasta 1979. Durante ese período, el virus SLE fue uno de los arbovirus aislados en la Isla de Majé. La presencia del virus SLE se detectó en diferentes años del estudio; pero no se determinó, si el virus era enzoótico en el área o era introducido periódicamente.

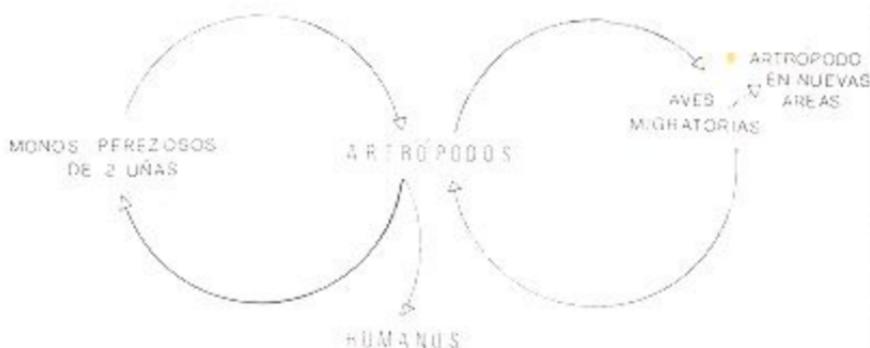
Los estudios serológicos realizados por el LCG en el área de Bayano para el virus de SLE (3,8) mostraron anticuerpos en monos nocturnos (*Aotus*) y en perezosos (*Choloepus hoffmanni*), en 19% y 63% respectivamente. Este alto

porcentaje de perezosos positivos confirmó la relación observada entre estos animales y el virus SLE (8,10). En 436 aves estudiadas, 25 (6%) mostraron títulos de anticuerpos (3). En la población humana del área de Bayano la tasa de anticuerpos contra el virus SLE fue de 19%. Las seroconversiones en animales centinelas se observaron, en forma aislada, durante los años 1973, 1976, 1978 (3), 1980, 1981 y 1982 (9); y en 1977, en forma epizootica (3).

Todos estos datos, aunque no aclararon totalmente el ciclo biológico del virus SLE, permitieron a los investigadores del LCG elaborar una hipótesis de trabajo. La hipótesis sostiene que el virus es enzoótico en el área de Bayano y que se mantiene mediante dos ciclos: uno arbóreo, que incluye artrópodos infectados (mosquitos y chitras flebotomíneas) y monos perezosos de dos uñas (*Ch. hoffmanni* (9, 10); y un ciclo de dispersión, que infecta artrópodos y aves migratorias presentes en el área periódicamente (Fig. 1), como es el caso de los cuervos marinos (*P. olivaceus*). Los estudios que el LCG realiza en la actualidad tienen como meta probar o descartar esta hipótesis.

El presente artículo comprende trabajos realizados en 1983 y 1984 con el virus de la Encefalitis de San Luis en la Isla de

FIGURA 1. CICLOS BIOLÓGICOS DEL VIRUS SLE.



Majé y sus alrededores; y la vigilancia epidemiológica de las poblaciones humanas residentes en áreas aledañas. Las investigaciones realizadas en las poblaciones humanas serán objeto de una publicación posterior.

#### Material y Método:

**Animales centinelas.** La forma en que se llevó a cabo el programa de animales centinelas entre 1972 y 1978 fue descrita por Galindo y col (3). Desde 1980 y hasta 1983 las estaciones situadas en la isla de Majé mantuvieron pollos o hámsteres centinelas. Solo en las estaciones localizadas en las torres A y B y en el puente Wetmore se mantuvieron pollos y hámsteres, al mismo tiempo, en la misma estación. Algunos se colocaron a nivel del suelo y otros,

en el dosel. Los animales se sangraban cada dos semanas, durante la estación lluviosa; y mensualmente, durante la estación seca. La estación quedaba sin centinela durante una a tres semanas al seroconvertir o morir el centinela.

A partir del 31 de mayo de 1983, cuando se observó nuevamente la actividad del virus SLE en Majé, se iniciaron los preparativos para las capturas de artrópodos y la reubicación de los animales centinelas con el fin de obtener datos que nos permitieran entender el ciclo del virus SLE en el área de Majé, Bayano.

En agosto de 1983, se estableció el programa de vigilancia del virus SLE en los animales centinelas. Fueron seleccionados 14

sitios a lo largo de los 1,000 metros de longitud del camino N-S que tiene la Isla de Majé. En cada sitio se colocaron dos estaciones: una a nivel del suelo y otra a una altura que variaba entre los 10 y 20 metros sobre el nivel del suelo, dependiendo de la altura y de la frondosidad de los árboles escogidos. Dos de los sitios, Torre A y el Puente Wetmore, incluían también alturas intermedias de manera que allí había 3 estaciones. El número de estaciones fue de 30. Las estaciones fueron numeradas en orden ascendente, a medida que se alejaban del campamento. En cada estación se expuso un pollo de aproximadamente un mes y un hamster de 4-6 semanas de nacido. En la torre A y en el puente Wetmore se incluyeron, además de jaulas con pollos y hámsteres, monos nocturnos y perezosos que han demostrado susceptibilidad al virus SLE (8,9,10). Todas las jaulas utilizadas con cada tipo de animales estaban protegidas contra la lluvia, pero permitían la entrada libre de los insectos picadores. Los centinelas se sangraban semanalmente; a los pollos, del ala; a los hámsteres, del seno retroorbital; y a los monos, de la vena femoral. El plasma obtenido se congelaba enseguida. A los centinelas enfermos o muertos se les extraía el cerebro, el corazón, los pulmones, hígado, bazo y riñón, que se congelaban de inmediato en nitrógeno líquido.

Los pollos y los hámsteres enfermos o muertos se reemplazaban de inmediato por animales susceptibles. Los que sobrevivieron tres meses fueron reemplazados y enviados al laboratorio central y sangrados una vez por semana, durante las 3 semanas siguientes. Los monos y los perezosos se mantuvieron en las estaciones hasta su seroconversión o su muerte.

El plasma de los centinelas se examinaba semanalmente para detectar anticuerpos contra SLE y otros dos flavivirus, el Ilheus y el Bussuquara, utilizando micropruebas de neutralización de placas en células de Vero (11). Los órganos fueron macerados según los métodos descritos (3) e inoculados en tubos de cultivo de células Vero. La identificación de los virus aislados se logró utilizando micropruebas de neutralización (11) y pruebas de inmunofluorescencia.

Recolección y procesamiento de artrópodos: La recolección de artrópodos en la Isla de Majé comenzó en 1972 y se suspendió en 1978; un estudio sobre mosquitos *H. equinus* fue el único que se mantuvo hasta 1983. En agosto de 1983, al detectar la presencia del virus SLE en los animales centinelas, se activó nuevamente la captura de artrópodos, utilizando métodos que diversificaron la obtención de las especies presen-

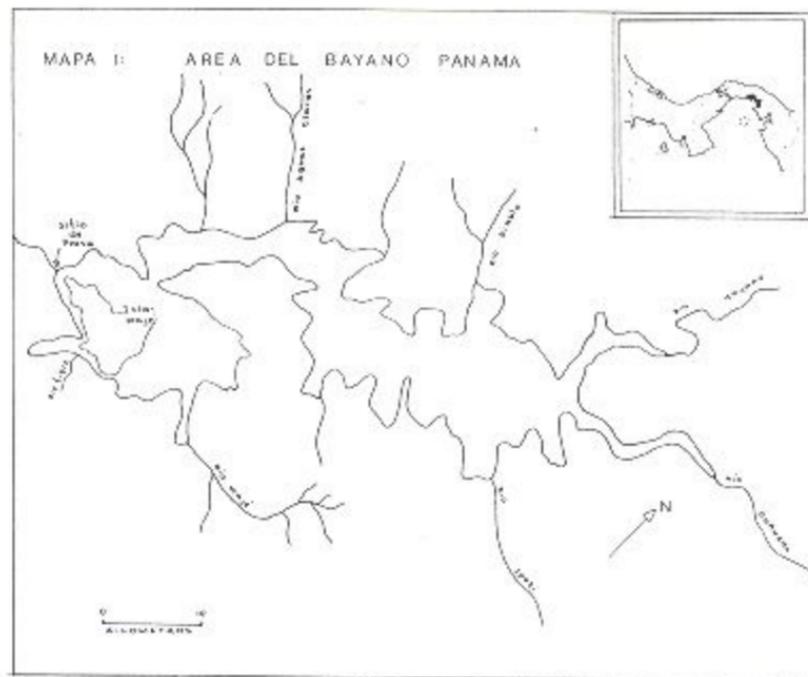
tes en la Isla. Se utilizaron trampas con y sin huéspedes, colocadas en el suelo y en el dosel de la selva; las capturas fueron, en la mayoría de los casos, tanto diurnas como nocturnas, y se realizaron durante tres días de cada semana. Se utilizaron trampas de los tipos BellamyReeves, Trinidad No. 10, Shannon, trampas de luz tipo CDC, redcillas, y cajas rojas; también se efectuaron capturas diurnas, utilizando hombres como cebo.

Los mosquitos congelados en nitrógeno líquido fueron transportados al laboratorio de entomología para su clasificación taxonómica. Allí se agruparon en números de 50, según la especie, la estación, la fecha y el método de captura. Los grupos de mosquitos se "sonificaron" y se inocularon en tubos de células Vero, observándose durante 21 días. Las suspensiones positivas para virus se identificaron utilizando los métodos de micropruebas de neutralización y de inmunofluorescencia indirecta.

Aves: La captura de las aves locales se realizó en tres áreas diferentes de la isla, una vez a la semana, utilizando redes de niebla que se abrían a las 6:00 horas y se cerraban a las 10:00 horas para reabrirse a las 14:00 y cerrarse a las 17:00 horas. La forma en que se atendieron las redes fue similar a las ya descritas en otras publicaciones (3). Las aves se sangraron de la vena yugu-

lar externa, se les colocaron bandas numeradas en una pata y se liberaban después de identificar la especie. El plasma congelado se llevó al laboratorio y la detección de anticuerpos contra el virus de SLE se efectuó utilizando las micropruebas de neutralización en placas, en células de Vero.

El estudio de las aves migratorias durante 1983 y 1984 se concretó a los cuervos marinos. La afluencia de estas aves al área del lago Bayano aumentó desde 1977; ese año su presencia se estimó en 10,000 o más aves (12). La presencia de los cuervos marinos en el área se detectó en el mes de septiembre, en cuatro sitios: Río Mono, Río Majé, Río Tigre y el estrecho del Guayabo (Mapa 1). En ese mes de septiembre se realizó la primera toma de sangre. El número de aves adultas continuó aumentando y en enero de 1984 se inició la formación de los nidos, en los troncos secos situados en la desembocadura de los ríos en el lago. A fines de enero de 1984 se efectuó el segundo sangramiento de aves adultas, en Río Tigre, en Río Mono y en las que anidaban en Río Majé; en febrero se sangraron aves adultas y pichones, en Río Tigre; y a fines del mes de marzo se sangraron los pichones emplumados, ya listos para abandonar los nidos, en Río Tigre. Las aves se sangraron durante la noche;



con ese fin se les iluminaba con lámparas hasta cegarlas, se subía al árbol, se capturaban con redes, se sangraban en la lancha, se les colocaba la banda de identificación y se liberaban.

### Resultados

Los animales centinelas que se-roconvirtieron contra el virus SLE, en la isla de Majé desde 1983, aparecen ordenados por fecha en la Tabla No. 1. Los aislamientos de virus obtenidos de los órganos de animales centinelas enfermos o muertos en la isla ascendieron a un total de 27, de los cuales 5 correspondieron a virus aislados de pollos centinelas y 22, de los órganos de hámsteres centinelas.

Una cepa del virus SLE se aisló de los órganos de un pollo centinela, que murió el 12 de junio

de 1983. Además, aislamos otros virus en pollos centinelas, que no eran SLE. El 29 de junio de 1983, se aisló el virus de la encefalitis equina del este (EEE); el 24 de julio el virus Turlock. El cuarto virus fue aislado de un pollo centinela, el 26 de enero de 1984 y no ha sido identificado aún. El 3 de febrero de 1984 se aisló el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), de un pollo centinela. Los aislamientos ocurrieron en centinelas de las estaciones 095, 074, 065, 045 y 025, respectivamente.

El virus de SLE no se ha aislado de hámsteres centinelas; pero los órganos de los 22 hámsteres centinelas positivos para virus han proporcionado los virus de VEE, EEE o Una. Existen todavía siete virus, probables causantes de la enfermedad de los centi-

TABLA No. 1

ANIMALES CENTINELAS QUE DESARROLLARON ANTICUERPOS  
CONTRA EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS DE SAN LOUIS EN  
LA ISLA DE MAJE EN 1983

FECHA DE LA SE ROCONVERSION	SEM: NAS PUESTAS	EX *	CENTINELA	ESTACION	NIVEL
MAYO 31/83	47		POLLO	063	DOSEL
JUNIO 7/83	56		POLLO	068	DOSEL
JUNIO 14/83	8		POLLO	065	DOSEL
JUNIO 21/83	4		POLLO	099	DOSEL
JUNIO 21/83	14		POLLO	045	DOSEL
JUNIO 21/83	7		POLLO	091	DOSEL
JUNIO 21/83	104		POLLO	051	SUELO
JUNIO 28/83	7		POLLO	091	SUELO
JULIO 6/83	47		POLLO	063	DOSEL
JULIO 6/83	48		POLLO	067	SUELO
JULIO 6/83	6		POLLO	097	SUELO
JULIO 6/83	2		POLLO	066	DOSEL
JULIO 26/83	5		POLLO	062	SUELO
AGOSTO 30/83	4		POLLO	099	DOSEL
SEPT 6/83	6		POLLO	062	SUELO
SEPT 6/83	6		POLLO	075	DOSEL
SEPT 27/83	9		POLLO	031	SUELO
OCTU 18/83	6		POLLO	062	SUELO
NOV 8/83	5		POLLO	063	DOSEL
DIC 13/83	10		POLLO	074	DOSEL

nelas, en proceso de identificación. El virus VEE se detectó en la Isla, del 15 de enero de 1984 hasta el 3 de febrero, cuando se retiraron los hámsteres centinelas de todas las estaciones para evitar amplificación del virus en el área. Los trece aislamientos

de este virus en hámsteres ocurrieron en 10 de las 30 estaciones, de las cuales 8 fueron estaciones a nivel del suelo y dos fueron estaciones colocadas en el dosel de la selva. Las diez estaciones estuvieron localizadas en áreas distintas, desde la orilla del lago

hasta el punto más alejado del camino N-S que recorre la Isla.

Los mosquitos capturados en Majé desde agosto de 1983 incluyen las especies y las cantidades indicadas en la Tabla No. 2.

TABLA No. 2

ESPECIES DE MOSQUITOS CAPTURADOS  
EN LA ISLA DE MAJE, DE AGOSTO A  
MARZO de 1983

<u>CULEX (C) NIGRIPALPOS</u>	5.695
<u>C. (M) OCOSSA</u>	5.636
<u>MANSONIA DYARI</u>	4.115
<u>HAEMAGOGUS EQUINUS</u>	889
<u>H. LUCIFER</u>	739
<u>CULEX (M) sp</u>	489
<u>H. JANTHINOMYS</u>	447
<u>CULEX (M) DUNNI</u>	431
<u>CULICOIDES</u>	303
<u>SABETHES CHLOROPTERUS</u>	270
<u>WYEMYIA sp</u>	266
<u>C. (M) CONSPIRATOR</u>	245
<u>CULEX (C) sp</u>	235
<u>URANOAEANIA sp</u>	142
<u>SABETHES sp</u>	92
<u>MANSONIA sp</u>	65
<u>AEDEOMYIA sp</u>	55
<u>ANOPHELES sp</u>	25
<u>Aedes sp</u>	24
<u>HAEMAGOGUS sp</u>	23
<u>LUTZOMYIA</u>	12
<u>OTROS</u>	86

Hemos obtenido siete aislamientos de virus en mosquitos. Dos provenían de *H. equinus* y

de *H. lucifer*, que fueron capturados el 25 de agosto en la estación 037, en una trampa Shannon que tenía un perezoso como cebo; ambos aislamientos continúan pendientes de identificación. El virus VEE se aisló de *Culex ocosa* el 12 de enero de 1984. Existen cuatro aislamientos más, obtenidos de *C. nigripalpus* (noviembre 8/83); *C. dunni* (diciembre 13, 15, 22/83); *M. dyari*, mezclados con *C. nigripalpus* (diciembre 21, 22/83); uno de mosquitos flebotomíneas, *Lutzomyia panamensis* (septiembre 14/83); todos están pendientes de identificación.

De las capturas semanales de aves en la Isla se obtuvo un total de 69 muestras de sangre; todas han sido negativas al virus SLE.

Los cuervos marinos fueron capturados en las áreas aledañas a la Isla, en cuatro ocasiones. En septiembre de 1983, las 44 aves adultas no mostraron anticuerpos contra el virus SLE. En enero de 1984, se sangraron 164 aves en total; 20 capturadas en la boca del Río Majé, 31 en Río Tigre y 49 en Río Mono. Se capturaron, también, 52 aves jóvenes y 12 pichones, en la boca del Río Majé. Todos resultaron negativos. En marzo del 84, se examinaron 22 aves adultas; una resultó con un nivel bajo de anticuerpos; los restantes fueron negativos. En abril de 1984 se capturaron 12 aves jóvenes y 52

pichones emplumados; todos resultaron libres de anticuerpos del virus SLE. El total de aves examinadas fue de 294.

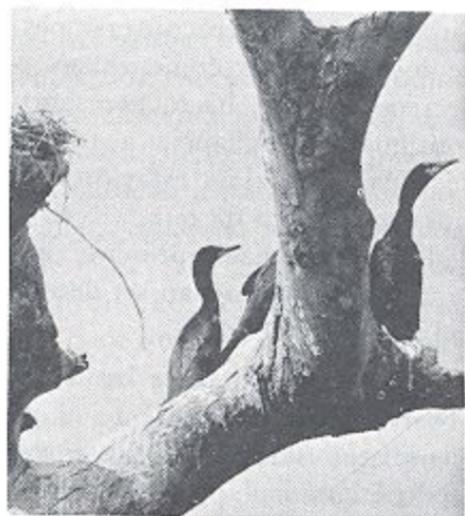


Figura No. 2

Cuervos marinos adultos (Foto Dr. J. Godoy).



Figura No. 3

Cuervos marinos en sus nidos (Foto Dr. J. Godoy).

El número de perezosos centinelas expuestos ha sido de sólo 3;



Figura No. 4

Cuervos marinos anidando en troncos secos a orillas del Lago Bayano (Foto Dr. J. Godoy).

actualmente estamos adaptando 4 animales más al cautiverio, al mismo tiempo que verificando la ausencia de anticuerpos, de modo que podamos usarlos como centinelas en la Isla. Estos perezosos provienen del área de El Aguacate (Capira).

### Comentarios

Los animales centinelas incluían aves y mamíferos y las seroconversiones para el virus aparecieron consistentemente en pollos, indicando la preferencia de los vectores portadores del virus por las aves. Esta situación fue diferente a la observada en 1977 por Galindo y col (3), en la que tanto los hámsteres como los pollos centinelas seroconvirtieron para el virus de SLE. De las 29 seroconversiones recientes,

observadas en pollos, sólo 9 ocurrieron en centinelas colocados a nivel del suelo. Pareciera haber preferencia de parte de los insectos vectores por los animales colocados en el dosel de la selva. La frecuencia mayor de seroconversiones ocurrió en el área de las estaciones 062 a 068, situadas en la parte más elevada y de vegetación más espesa y exuberante de la Isla. Las capturas de artrópodos y la exposición de perezosos de dos uñas como centinelas han sido intensificadas en esta área, con el objeto de identificar los vectores y determinar si los perezosos son hospederos que mantienen el virus en época de baja densidad de artrópodos.

Este último año las poblaciones de mosquitos fueron abundantes, lo que no se ha podido comparar con los 3 años anteriores por falta de datos entre 1979 y 1982. En el año de 1977, cuando hubo numerosas seroconversiones y aislamientos de SLE sólo comparable a lo observado en este año, hubo abundancia de "lechuga de agua" (*Pistia stratiotes*) que favoreció la proliferación de varias especies de mosquitos, entre ellos *M. dyari*, *C. ocosa* y *Aedeomyia squamipennis* (3). Este último año también notamos abundancia de "lechuga de agua". Los métodos de captura variaron y sin embargo las especies más abundantes fueron: *C. nigripalpus*, *C. ocosa* y

*M. dyari*. En los nueve meses que duran nuestras capturas de artrópodos no hemos logrado aislar el virus de SLE; pero nuestras capturas se intensificaron cuando las seroconversiones de los centinelas comenzaban a decrecer. Esto hace necesario continuar la vigilancia a través de toda la próxima estación lluviosa, en espera de que la actividad viral se haga presente en cantidades que puedan ser detectadas en artrópodos.

Los cuervos marinos han sido observados detalladamente. Los ejemplares sangrados, tanto de adultos como de pichones, parecen adecuados; sin embargo, no se han observado seroconversiones entre septiembre y abril, época en que estas aves migratorias estuvieron presentes en el área de Majé. Durante la anidación de las aves, ocurrida de diciembre a marzo, no se detectó actividad viral en la Isla, aunque el número de mosquitos y la variedad de especies permitían las transmisiones, de haber una adecuada existencia de virus circulante.

Los estudios experimentales en perezosos realizados por Seymour y col (8,10) y por Galindo (9), confirman la susceptibilidad de este animal a las cepas locales del virus SLE. En la isla de Majé, el número estimado de perezosos de dos uñas es elevado; pero este estudio no ha considerado la captura y sangramiento de animales

libres, sino más bien el seguimiento de perezosos centinelas colocados en puntos estratégicos, en espera de seroconversiones para el virus SLE. Para mantener a los perezosos como centinelas en jaulas fue necesario adaptarlos a una alimentación especial; una dieta consistente en apio, manzanas, guineos, lechuga, zanahorias, yuca y agua, ha sido adecuada para ellos. A la 2 ó 3 semanas de cautiverio comienzan a comer, lo que hace posible entonces enviarlos a las estaciones fiscalizadas en el dosel de la selva. Esto permitirá que los estudios dirigidos a entender el ciclo del virus SLE en las selvas tropicales continúen.

El Laboratorio planea seguir estas observaciones durante la estación lluviosa de 1984, en es-

pera de aislamientos del virus en vectores y vertebrados hospederos.

## SUMMARY

St. Louis Encephalitis virus has been detected periodically in the Bayano area of Panama where the Gorgas Memorial Laboratory has maintained a constant surveillance program since 1972. This report presents the findings of surveillance studies conducted during the rainy season of 1983 and the dry season of 1984. Twentyone of exposed sentinel checks seroconverted, but no seroconversion was detected in local or migratory birds. No viral isolates were made from any of the 25 species of arthropods captured using several different trapping methods. This SLE surveillance continues as part of an ongoing two-year study.

El agradecimiento de los investigadores a los siguientes colaboradores por su trabajo en el campo; R. Hinds, N. Guerrero, V. Herrera, N. Rojas y L. Mendoza; en entomología; O. de Torres; y en virología y serología; M. García, R. Vilechez, J. Cisneros.

## REFERENCIAS

1. Aitken THG, Downs WG, Spence L, Jonkers AH: St. Louis Encephalitis Virus isolations in Trinidad West Indies, 1953-1962, *Am J Trop Med Hyg* 13: 450-451, 1964
2. Spence LP: St. Louis Encephalitis in Tropical America, en *St. Louis Encephalitis*, ed por Monath TP, APHA, 1980, pp 451-471
3. Galindo P, Adames AJ, Peralta PH, Johnson CM, Read R: Impacto de la hidroeléctrica de Bayano en la transmisión de arbovirus *Rev Méd Panamá* 8(2): 89-134, 1983.
4. Galindo P, Rodaniche E, Johnson C: St. Louis Encephalitis in Panama. I. Isolation of the virus from forest mosquitoes and human blood, *Am J Trop Med Hyg* 8:557-560, 1959
5. Galindo P, Peralta PH, Mackenzie RB, Beye HK: St. Louis Encephalitis in Panama: A review and a progress report. *Am J Trop Med Hyg* 13: 455, 1964

6. Rodaniche E, Galindo P: St. Louis Encephalitis in Panama. III. Investigation of local mammals and birds as possible reservoir hosts, *Am J Trop Med Hyg* 10:390-392, 1961
7. Brinker KR, Monath TP: The acute disease, en St. Louis Encephalitis, ed por Monath TP, *Am Pub. Health Ass*, 1980, pp 503-535
8. Seymour C, Peralta PH, Montgomery GG: Serological evidence of natural flavivirus infections in Panamanian sloths and other vertebrates, *Am J Trop Med Hyg* 32:854-861, 1983
9. Galindo P: Comunicación personal
10. Seymour C, Kramer LD, Peralta PH: Experimental St. Louis Encephalitis virus infection of sloths and cormorants, *Am J Trop Med Hyg* 32:844-853, 1983.
11. Early E, Peralta PH, Johnson KM: A plaque neutralization method for arboviruses, *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 741-747, 1967
12. Montgomery G: Comunicación personal