

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CEPAS VENEZOLANAS DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE

Phylogenetic Analysis of Venezuelan Strains of the Eastern Equine Encephalitis Virus

María C. González^{*1}, Flor Herrera^{**}, Heriberto Correia^{**} y Johanny Ruíz^{**}

**Laboratorio Clínico, División de Servicio Médico Asistencial y Preventivo Campus Maracay, Universidad Central de Venezuela, **Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo-Sede Aragua*

Correo-E:mcgm1957@hotmail.com

Recibido: 10/05/12 - Aprobado: 13/07/12

RESUMEN

Se realizó un estudio molecular de cinco cepas de virus de encefalitis equina del este (VEEE) mediante secuenciación de productos obtenidos en el ensayo de transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Secuencias de ~ 500 pb de la región 3' no traducible del genoma se compararon con secuencias homólogas variantes Sur Americana (SA) y Norte Americana (NA) del complejo VEEE. La cepa EE VE02 EL PAO, con la cual se desarrolló una vacuna inactivada oleosa tuvo más similitud con la cepa EE VE76 EL DELIRIO, seguida por EE VE75 CATATUMBO, EE VE96 MLLANO y EE VE84 TUCACAS respectivamente. La alineación de secuencias entre las cepas típicas reveló diferencias de 2,82 a 8,48 %. En tanto que, la cepa EE VE02 EL PAO difirió en un 8,86 % de la de Perú (EE PE-0,0155 del linaje III) y en un 38,08 % de la de EEUU (EE-PE-6 del linaje I, usada en vacunas comerciales). Los resultados indican que las cepas autóctonas tuvieron más similitud con la cepa SA, que con la NA. Se han identificado cuatro principales linajes en el complejo de VEEE (I-IV). El árbol filogenético evidenció dos clado: uno que agrupa los linajes I-III y el otro, el linaje

ABSTRACT

A molecular study of five strains of the eastern equine encephalitis virus (EEEV) was conducted by sequencing of products generated using the reverse transcriptase assay, coupled to the polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequences of approximately 500 pair of bases from the non-translated 3' region of the genome were compared with homologous sequences of the South American (SA) and North American (NA) variants of the EEEV complex. The EE VE02 EL PAO strain, used to develop an inactivated oil vaccine had most resemblance with the EE VE76 EL DELIRIO strain, followed by the EE VE75 CATATUMBO, the EE VE96 MLLANO and the EE VE84 TUCACAS strains, respectively. The alignment of sequences among typical strains revealed differences of 2.82 and 8.48%, respectively, while the EE VE02 EL PAO strain differed in 8.86% from the *Perú* strain (EE PE-0.0155, from lineage III) and in 38.08% from the NA strain (EE-PE-6, from lineage I, used in commercial vaccines). The results of the present investigation indicate that the autochthonous strains have more similarity with the SA strain than with the NA strain. Four major lineages (I-IV) in the EEEV complex have been identified. The

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

IV. La mayoría de las secuencias están contenidas en el primer clado que, a su vez, se separa en dos grupos que contienen secuencias del linaje I y secuencias de los linajes II-III y, debido al valor *bootstrap* alto (99%), los grupos se consideran completamente distintos. Sin embargo, éste no es el caso del grupo que contiene a los linajes II-III porque éstos se separan sólo el 53% de las veces, pero se asume que las cepas venezolanas pertenecen al linaje III dividido en dos subclados: IIIA y IIIB.

(Palabras clave: Virus de encéfalo mielitis equina, filogenia, PCR, transcriptasa inversa, diferencias biológicas)

INTRODUCCIÓN

El Virus de Encefalitis Equina del Este (VEEE) causa enfermedad en humanos, equinos y otros animales domésticos constituyendo un problema de salud pública. Éste virus pertenece a la familia Togaviridae, género *Alfavirus*, su genoma es de una sola cadena de ARN de sentido positivo, no segmentado de 11 a 12 kilobases (Garmashova et al., 2007; Aguilar et al., 2008; Paessler y Weaver, 2009). En el extremo 5' del genoma se localizan genes que codifican cuatro proteínas no estructurales (nsP1–nsP4) y el extremo 3' no se traduce a partir de ARN genómico, sino que se expresa como una molécula de ARNm subgenómico (ARNm 26S) que codifica cinco proteínas estructurales (C, E1, E2, E3 y el polipéptido 6 kDa) (Weaver et al., 1994; Brault et al., 1999). En las células infectadas por *Alfavirus* se encuentran dos tipos de ARN viral, el ARNm 42S (poliadenilado ~11,5 Kb), el cual es empacado en los viriones maduros y funciona como el mensajero de las proteínas no estructurales y el ARNm 26S (Kondig et al., 2007). El VEEE es una sola especie y se han distinguido dos variantes antigénicas, la Norte Americana (NA) que se distribuye en Canadá, EEUU y el Caribe, y la Sur Americana (SA) que se distribuye en América Central y del Sur, siendo la variante NA la más virulenta para todas las especies (Brault et al., 1999; Aguilar et al., 2007; Gould et al., 2009). En Sur América, la enfermedad en humanos es escasa y las

phylogenetic tree evidenced two clades, one which groups lineages I-III and another, lineage IV. Most of the sequences are contained in the first clade, which at the same time, separates into two groups containing sequences of lineage I and lineages II-III; and, due to the high bootstrap value (99%) the groups are considered completely different. However, this was not the case of the group which enclosed the lineages II and III; because these only separate 53% of the time, but it is assumed that the Venezuelan strains belong to lineage III, which diverges into two subclades: IIIA and IIIB.

(Key words: Equine encephalomyelitis virus, phylogeny, PCR, reverse transcriptase, biological differences)

epizootias son limitadas, pero la enfermedad es grave. Los ciclos de transmisión difieren considerablemente entre la variante NA y SA (Brault et al., 1999; Weaver et al., 1999). Esta diferencia se atribuye a los distintos hábitos de los vectores que transmiten el virus fuera de los focos naturales. Mientras que *Aedes sollicitans* en Norte América es antropofílico y activo durante el día, *Culex taeniopus* en Sur América, es predominantemente selvático, de actividad crepuscular y no se introduce en las casas, por lo tanto, sólo desempeña un papel de vector enzoótico (Acha y Szyfres, 1986).

En la Guajira venezolana, se han realizado aislamientos de VEEE y virus de encefalitis equina venezolana (VEEV) en mosquitos *Culex melanoconium*, sugiriendo que estos mosquitos son vectores importantes de estos virus y que están involucrados en el mantenimiento del mismo durante períodos interepizooticos. Las epizootias de VEEE requieren de vectores accesorios y amplificación en hospederos para que el virus migre fuera del ciclo enzoótico (Walder et al., 1984; Weaver et al., 1994). En tal sentido, el *Culex melanoconium panacossa* y el *Culex melanoconium dunnii* han sido los principales mosquitos involucrados en la transmisión de estos virus en la Guajira venezolana, y es posible que el VEEE y el VEEV enzoóticos, subtipo ID, tengan básicamente una ecología similar como: replicación, viremia, amplificación en especie de *Culex melanoconium* y producción de infección en mamíferos como: roedores silvestres

(ratas y ratones) y marsupiales (rabipelados) Walder *et al.*, 1984). La región del Catatumbo en Venezuela, es un foco enzoótico de VEEV con potencial de generar fenotipos epizooticos por pequeño número de mutaciones (Moncayo *et al.*, 2001). La Encefalitis Equina Venezolana (EEV) es raramente reconocida durante períodos interepizooticos; sin embargo, Quiroz *et al.* (2009) reportaron casos clínicos neurológicos de EEV, en humanos, en Panamá, incluyendo infección fatal con cepas de VEEV enzoóticas subtipo ID, que circulan en los vectores y roedores selváticos. No obstante, las epizootias aparentemente requieren de cambios genéticos que convierten las cepas enzoóticas avirulentas en serotipos epizooticos, por lo que los estudios epidemiológicos moleculares son importantes y pueden proveer la habilidad de entender y controlar futuras emergencias epizooticas (Weaver *et al.*, 1999).

En el complejo de VEEE, la variante SA presenta un mayor grado de diversidad genética y antigénica que la NA y se han identificado cuatro principales linajes. El linaje I comprende la variante NA, estos aislados son altamente conservados en sus secuencias nucleotídicas. Los linajes II-IV comprenden la variante SA, los cuales presentan una considerable heterogeneidad genética y antigénica (Brault, *et al.*, 1999; Weaver, *et al.*, 1999).

El análisis de polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas de ADN complementario (ADNc) de un fragmento de la región 3' no traducible y uno de la región del gen nsP4, ha permitido obtener una visión preliminar y determinar que existían diferencias genéticas en estas regiones del genoma entre la cepa EE VE02 EL PAO (con la cual se ha preparado una vacuna inactivada oleosa) y de otras cepas autóctonas de VEEE (González *et al.*, 2009; González, 2010). Sin embargo, para conocer algunas de estas diferencias, se planteó secuenciar un fragmento de la región 3' no traducible de la cepa EE VE02 EL PAO y de otras cepas autóctonas de VEEE, realizar análisis genético para determinar su genotipo y relaciones filogenéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de VEEE que se secuenciaron en este estudio se presentan en la Tabla 1. Los virus se adaptaron a crecimiento, se replicaron primero en cerebro de ratón lactante, cepa BALBc de 3 d de edad

y luego en monocapa de cultivo de células Vero (riñón de mono verde africano) con tres pases. El cultivo viral se recolectó después de los efectos citopáticos evidentes entre 48 y 72 h. El ARN se extrajo mediante el método de fenol cloroformo con tiocianato de guanidina, de acuerdo a Urdaneta *et al.* (2005). El ARN se preservó a -80 °C hasta que se efectuó el ensayo de transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Se utilizaron los cebadores altamente conservados E-11118 (+) (5' TTACCTGCAAAGGRGATTG 3') y el E-11660 (-) (5' GAAATATTAAAAACAAAATA 3') para amplificar fragmentos de ADNc de ~ 500 pb de la región 3' no traducible de acuerdo a Brault *et al.* (1999). La RT-PCR se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por González *et al.* (2009). Se utilizó el *Kit Access RT-PCR System* (Promega, EUA) para amplificar el ADNc de las cepas de VEEE, y para verificar su pureza y concentración se utilizó un marcador de tamaño de ADN de bajo peso molecular, y concentración conocida (Invitrogen Life Technologies, Brasil). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Kit Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems Inc., Foster City, C.A. EUA). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10 µL que contenía: mezcla *Big Dye Terminator*, tampón de secuenciación, 3,2 pmol/µL de cebador sentido o antisentido según la hebra, el volumen de ADNc se agregó según su concentración (5 - 20 ng) y agua ultra pura. Para efectuar la reacción de secuenciación se programó el termociclador (*MJ Research PT-100, Inc., EUA*) bajo los siguientes números de ciclos y condiciones de temperatura: 1 ciclo a 96°C por 1 seg, seguido de 25 ciclos a 96°C por 10 seg, 48°C por 1 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 1 seg, 60°C por 4 min y por último a 4°C por 1 seg. Los productos obtenidos en la reacción de secuenciación se purificaron mediante el método de precipitación con etanol acetato de sodio (Sambrook y Russell, 2001) y se secuenciaron en un equipo automático 3130 ABI PRISM® (*Applied Biosystems Inc., Foster City, C.A. EUA*). Las secuencias fueron editadas mediante el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.1* (Hall, 1999; *Sequence Analysis Software, 2007*) y alineadas mediante el programa *Clustal W and Clustal X versión 2.0* (Larkin *et al.*, 2007) para determinar el genotipo de las cepas de VEEE (Tabla 1), compararlas con otros virus de

Tabla 1. Cepas de VEEE venezolanas analizadas en este estudio

Código	Cepa	Lugar de Aislamiento	Año de Aislamiento	Hospedero	Código Laboratorio de Origen
EE VE02 EL PAO	El Pao	El Pao, Cojedes	2002	Equino	259194 (EEE)
EE VE96 MLLANO	Las Mercedes Del Llano	Las Mercedes Del Llano, Guárico	1996	Equino	251349 (EEE)
EE VE84 TUCACAS	Tucacas	Tucacas, Falcón	1984	Equino	254762 (EEE)
EE VE76 EL DELIRIO	El Delirio	Santa cruz, Zulia	1976	Equino	Delirio (EEE)
EE VE75 CATATUMBO	El Catatumbo	El Catatumbo, Zulia	1975	Hámster Centinela	270414(EEE)

los complejos de VEEE y VEEV disponibles en el banco de genes (Tablas 2 y 3) y determinar el porcentaje de identidad. El árbol filogenético fue generado usando el programa MEGA4 versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) y se obtuvo por el método de Máxima Parsimonia, corregido por el método del Vecino más Cercano. Los análisis fueron sustentados con valores de confianza basados en 100 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer paso para determinar las relaciones filogenéticas entre las secuencias de la región 3' no traducible de 5 cepas de VEEE venezolanas con secuencias disponibles en el banco de genes, consistió en producir un alineamiento múltiple. En la Figura 1, se comparan las secuencias de las cepas autóctonas con la de la cepa EE PE-6 variante NA del linaje I, la cual se utiliza en la preparación de vacunas comerciales inactivadas contra el VEEE para uso humano y equino (Dietz *et al.*, 1980; Strizki y RepiK, 1995) y con la cepa EE PE-0,0155 variante SA del linaje III. Los genomas del linaje I son altamente conservados y sólo difieren hasta un 2 % en sus secuencias nucleotídicas (Brault *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999). En el alineamiento se tomó como referencia la cepa venezolana EE VE02 EL PAO, la cual se usó como semilla de virus para preparar una vacuna inactivada oleosa (González, 2010) y se encontró que el porcentaje

de nucleótidos idénticos tiene el siguiente orden: 1) cepa EE VE76 EL DELIRIO (97,18%), 2) cepa EE VE75 CATATUMBO (93,96%), 3) cepa EE VE96 MLLANO (93,50%) y 4) cepa EE VE84 TUCACAS (91,54%). A su vez, la secuencia de la cepa EE VE02 EL PAO también se alineó con la cepa de Perú (EE PE-0,0155) teniendo 91,14% de nucleótidos idénticos y en su alineación con la cepa de EEUU (EE PE-6) tuvo un 61,98% de nucleótidos idénticos. Se encontraron huecos y sustituciones de nucleótidos en todos los aislados con respecto a la variante NA (Figura 1). Los resultados indican que la cepa EE VE02 EL PAO tuvo más similitud con las otras cepas autóctonas y con la cepa EE PE-0,0155 variante SA, que con la cepa EE PE-6 variante NA. La divergencia nucleotídica entre las cepas autóctonas de VEEE con respecto a la cepa EE VE02 EL PAO fue de 2,82 a 8,46%. Esta divergencia genética puede estar asociada al vector, al hospedero, al año de circulación y a la localización geográfica donde estas cepas virales fueron aisladas. Powers *et al.* (2006), sugieren que los patrones de diversidad genética dependen de la migración de estos virus a nuevos nichos ecológicos. Éstos subsecuentemente establecen focos enzoóticos discretos, en los cuales el virus es mantenido siguiendo rutas evolutivas diferentes. Estos patrones de diversidad genética son afectados por el vector y los hospederos vertebrados enzoóticos. La cepa EE VE02 EL PAO difirió de la variante NA

Tabla 2. Cepas del complejo VEEE usadas para análisis filogenético disponibles en el banco de genes

Linaje y Variante	Cepa Código	Localización	Año	Fuente	N° Acceso Banco Genes	Referencia
I (NA)	EE PE-6	Vacuna	AY722102.1	Schoepp <i>et al.</i> (2005)
I (NA)	EE FL 82V-2137	Florida EEUU	1982	Mosquito	UO1032	Weaver <i>et al.</i> (1993)
I (NA)	EE FL 91-4697	Florida EEUU	1991	Mosquito	AY705241.1	Platteborze <i>et al.</i> (2005)
II (SA)	EE GU 68-68U230	Guatemala	1968	Hámster Centinela	AF421511.1	Brault <i>et al.</i> (1999)
II (SA)	EE BR 65-81828	Brasil	1965	Mosquito	AF421505.1	“
II (SA)	EE BR 67-126650	Brasil	1967	Mosquito	AF421508.1	“
II (SA)	EE BR 75-300851	Brasil	1975	Mosquito	AF421517.1	“
III (SA)	EE PE-0,0155	Región Amazónica (Perú)	1996	Mosquito	DQ241304.1	Kondig <i>et al.</i> (2007)
III(SA)	EE VE 96-250714	Venezuela	1996	Equino	AF421532.1	Brault <i>et al.</i> (1999)
III(SA)	EE BR 60-18205	Brasil	1960	Equino	AF421502.1	“
III(SA)	EE BR 83-416361	Brasil	1983	Ave	AF421529.1	“
III(SA)	EE BR 83-414556	Brasil	1983	Ave	AF421526.1	“
III(SA)	EE CO 92-C49	Colombia	1992	Hámster Centinela	AF4211535.1	“
IV(SA)	EE BR 85-436087	Brasil	1985	Mosquito	AF159561	Powers <i>et al.</i> (2001)

Tabla 3. Cepas del complejo VEEV usadas para análisis filogenético disponibles en el banco de genes

Linaje	Cepa Código	Localización	Año	Fuente	N° Acceso Banco Genes	Referencia
IAB	EV TC-83	Vacuna	L01442.2	Kinney <i>et al.</i> (1986)
IAB	EV TRD43	Trinidad Donkey	1943	Burro	J04332.1	Kinney <i>et al.</i> (1989)
IV	EV ARG80-663	Argentina	1980	Mosquito	AF075258.1	Kinney <i>et al.</i> (1998)

	10	20	30	40	50
EE VE02 EL PAO	TATCGTTCGAT	TACCCAGCCC	AACATACAGA	AACATTACAG	TCTGCAGTAT
EE VE76 EL DELIRIO	-*T*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	-*T*A*+*+*	+*+*G*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*G*+*+*
EE VE84 TUCACAS	+T*G*A*+*+*	+*+*+*G*A*+*	+*+*+*+*+*G	+*+*+*+*+*	+*+*G*+*G*
EE VE75 CATATUMBO	-*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*G*+*+*
EE PE-O.0155	C*T*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*G*+*+*
EE PE-6	-*+*+*+*+*	+*T*+*+*+*A*	+*+*+*+*+*T*	+*T*C*+*T*+*	+*G*+*G*A*+*
	60	70	80	90	100
EE VE02 EL PAO	CGGCCACAGC	GTGGTCATGG	TTGAAAAGTGC	TAGTAGGTAG	CACTTCGGCA
EE VE76 EL DELIRIO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	C*+*+*G*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*+*	C*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE84 TUCACAS	+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*G*+*	C*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*A*G*
EE VE75 CATATUMBO	+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*G*+*	C*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-O.0155	+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*+*	C*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-6	+*C*+*+*+*C*+*	+*+*+*+*G*+*	A*A*+*+*+*+*	+*G*+*+*+*AG*	A*A*+*+*+*+*
	110	120	130	140	150
EE VE02 EL PAO	TTTATAGTCC	TAGGGCTGAT	CGCCACTGCG	GGGGTCGCAC	TGGTACTATT
EE VE76 EL DELIRIO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*T*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE84 TUCACAS	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	T*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*G*+*
EE VE75 CATATUMBO	+*+*+*+*+*A*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*T*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-O.0155	+*+*C*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*T*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-6	+*+*+*+*C*+*T*	+*G*+*+*+*+*T*	T*+*T*+*A*+*A*	+*T*+*+*+*C*+*	+*A*+*+*+*G*+*
	160	170	180	190	200
EE VE02 EL PAO	TACCCACAAA	CACTAAAAGT	GGATGCTA	C-CAACACTA	T-----TAT
EE VE76 EL DELIRIO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	-*A*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	-*A*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*T*	+*+*+*+*+*G*
EE VE84 TUCACAS	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	-*A*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*T*	+*+*+*+*+*G*
EE VE75 CATATUMBO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	-*A*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*T*	+*+*+*+*+*T*
EE PE-O.0155	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	-*A*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*T*	+*+*+*+*+*G*
EE PE-6	C*+*+*+*T*+*G*	+*+*+*+*C*A*+*C*	T*+*+*+*C*A*A*+*C*	+*A*+*+*+*+*+*	C*+*+*+*+*G*+*
	210	220	230	240	250
EE VE02 EL PAO	A-----	-----	-----T	TCGTTGTTTCG	ATGTACTTCC
EE VE76 EL DELIRIO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE84 TUCACAS	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*C*+*G*+*G*+*	+*+*+*+*+*G*+*
EE VE75 CATATUMBO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-O.0155	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-6	+*+*A*+*G*+*G*+*C*+*T*+*G*+*	+*+*+*+*+*C*+*T*+*A*+*A*+*A*+*C*+*	+*+*+*+*+*A*+*T*+*C*+*	+*+*C*+*C*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*
	260	270	280	290	300
EE VE02 EL PAO	GAGCAGCGGT	AAAGGTGGTG	CATAATGCCA	CCTGCGCAGT	GCATAATGCT
EE VE76 EL DELIRIO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE84 TUCACAS	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE VE75 CATATUMBO	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-O.0155	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*
EE PE-6	+*+*+*+*T*+*A*+*+*+*	+*+*+*+*+*G*+*+*C*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*C*+*+*+*+*+*G*+*	+*+*+*+*+*G*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*G*+*+*
	310	320	330	340	350
EE VE02 EL PAO	GCGC-GCGTT	TAGCCTATTG	GCCTA--TAT	AAC-CACACT	ACAGGTAGCT
EE VE76 EL DELIRIO	+*+*G*+*+*A*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*
EE VE96 MLLANO	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*
EE VE84 TUCACAS	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*
EE VE75 CATATUMBO	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*
EE PE-O.0155	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*
EE PE-6	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*	+*+*+*+*+*+*

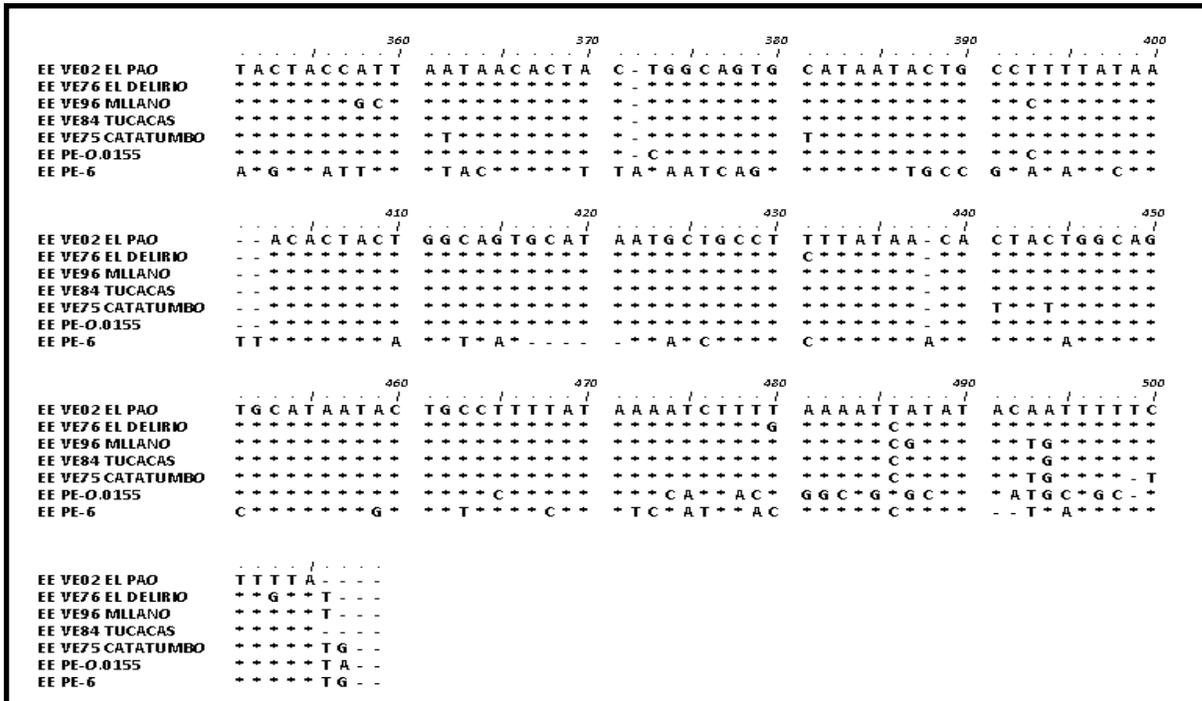


Figura 1. Alineación de secuencias de nucleótidos de la región 3' no traducible de cepas autóctonas de VEEE con una cepa variante SA (EE PE-0,0155) y con una cepa variante NA (EE PE-6) del complejo de VEEE.
 (*) Indica que el nucleótido es idéntico. (-) Indica ausencia de nucleótido

de EEUU (EE PE-6 del linaje I) en un 38,08% y de la variante SA de Perú (EE PE-0,0155 del linaje III) en un 8,86%. Estos resultados son similares a los reportados por Brault *et al.* (1999), quienes señalan que las cepas NA tienen diferencias de un 25 a 38% de las SA y que es evidente una considerable heterogeneidad genética en el grupo SA, el cual comprende 3 linajes con diferencias de 11-25%.

En esta perspectiva, González *et al.* (2009), encontraron polimorfismo genético entre las cepas autóctonas, lo que refleja la característica de las cepas SA. Sin embargo, esta diversidad genética de las cepas venezolanas no impidió que los anticuerpos, inducidos por la vacuna inactivada oleosa contra la cepa EE VE02 EL PAO, neutralizaran *in vitro* y protegieran en el desafío, a cobayos (*Cavia porcellus*), frente a estas cepas virales vivas (González, 2010). Esto sugiere que los componentes antigénicos que conforman la vacuna son compartidos por todas las cepas autóctonas. A diferencia, de lo reportado por Siger *et al.* (2004), para vacunas comerciales preparadas con cepas NA, las cuales no soportaron el desafío con cepas autóctonas en las pruebas de potencia y habían cumplido con estos controles en su país de origen.

Se construyó un árbol filogenético sin raíz, con las secuencias del segmento de la región 3' no traducible de las cepas autóctonas estudiadas (Tabla 1), las cuales fueron alineadas con secuencias homólogas de cepas del complejo de VEEE disponibles en el banco de genes (Tabla 2). Secuencias homólogas de cepas de VEEV se usaron como grupo externo (Tabla 3). El árbol filogenético sin raíz (Figura 2) demostró dos clados. Uno que agrupa los linajes I-III y el otro el linaje IV con un valor de bootstrap alto (84%). Este último linaje es un grupo monofilético conformado por un sólo aislado de Brasil. La mayoría de las secuencias están contenidas en el primer clado. A su vez, este clado se separa en dos grupos que contienen secuencias del linaje I y secuencias de los linajes II-III y, debido al valor de bootstrap alto (99%), los grupos se consideran completamente distintos. En el grupo del linaje I se evidencia una monofilia de las cepas NA; en los linajes II-III se distribuyen las cepas SA, incluyendo las venezolanas. Estos resultados son similares a la clasificación antigénica y genética del complejo de VEEE reportada por Weaver *et al.* (1994), Brault *et al.* (1999) y Weaver *et al.* (1999), en el cual el linaje I corresponde con la variante NA y los linajes II-IV

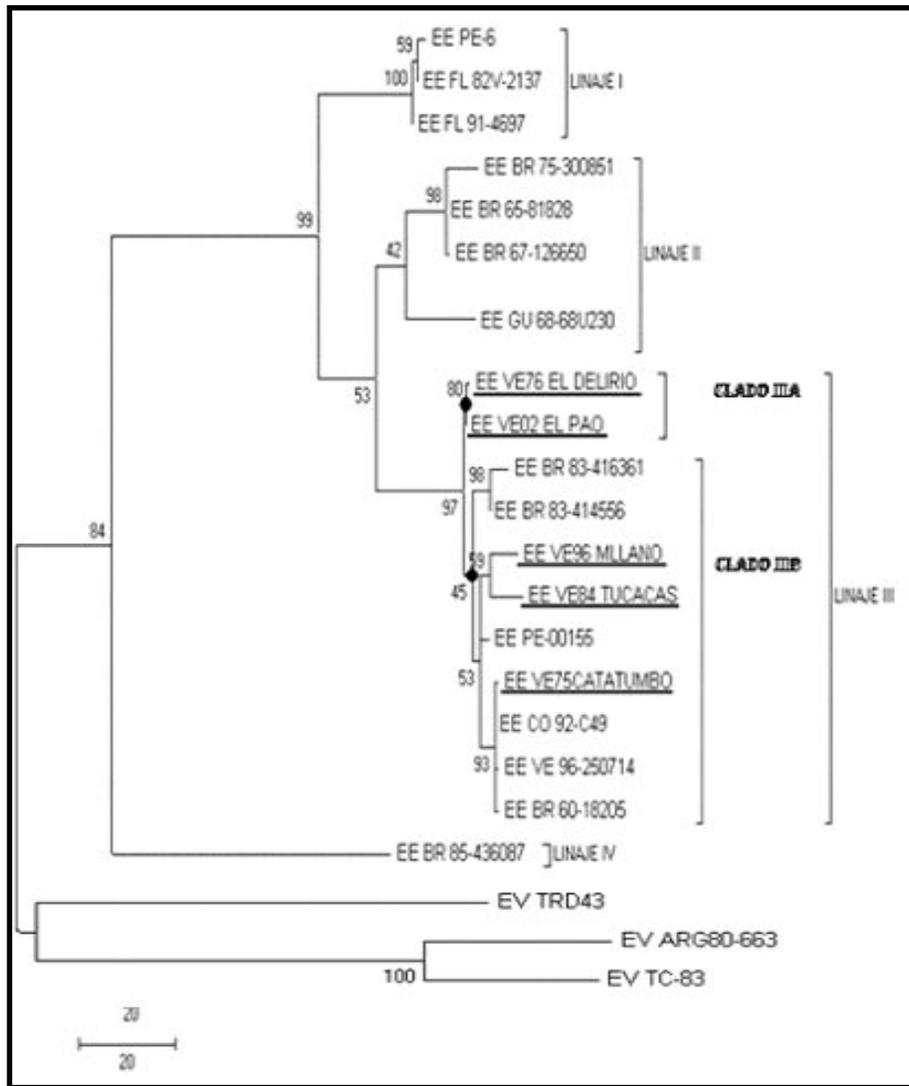


Figura 2. Árbol filogenético generado de las secuencias de nucleótidos de la región 3' no traducible de cepas de VEEE autóctonas y de secuencias de cepas del complejo de VEEE disponibles en el banco de genes. Las unidades de la escala del árbol indican el número de cambios sobre la secuencia completa. Secuencias homólogas de cepas de virus de encefalitis equina venezolana se usaron como grupo externo

corresponden con la variante SA. En el grupo del linaje I se evidencia una monofilia (*bootstrap*=100%) y allí están agrupados las cepas de la variante NA. Ahora bien, los linajes II y III se separan sólo el 53% de las veces y por ese valor *bootstrap* bajo no se puede considerar totalmente diferente (Soltis y Soltis, 2003). Sin embargo, se asume que las cepas venezolanas son del linaje III, dado a que estas cepas se ubicaron junto con el grupo linaje III del banco de genes. A su vez, el linaje III se divide en dos subclados: IIIA y IIIB con un valor *bootstrap* de 97 %. En el clado IIIA se agruparon exclusivamente dos aislados de Venezuela

y en el clado IIIB se agruparon aislados de Brasil, Venezuela, Perú y Colombia. Éstos resultados son similares a los reportados por Medina (2007), quién analizó un fragmento de 1,2 Kb correspondiente a la secuencia de la proteína E1 y región 3' no traducible, de aislados de VEEE venezolanos, los cuales se ubicaron dentro del linaje III dividido en dos subclados: IIIA y IIIB. Por otra parte, Brault *et al.* (1999) trabajó con secuencias de las regiones 3' no traducible, proteína no estructural nsP4 y proteína estructural E2 de las cepas EE VE76 EL DELIRIO y EE VE96 MLLANO, las cuales se ubicaron en dos subclados distintos del

linaje III. Asimismo, la comparación de las secuencias venezolanas con las registradas en el banco de genes demuestra que son secuencias únicas.

Estudios preliminares para los aislados de VEEE SA han mostrado diversidad genética en las secuencias nucleotídicas y de los aminoácidos, clasificando a esta variante en tres genotipos: II, III y IV (Weaver *et al.*, 1994; Brault *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999). Al igual que los resultados obtenidos por estos autores, el análisis filogenético de los aislados autóctonos de VEEE demostró divergencias genéticas entre ellos. Este resultado permite corroborar la heterogeneidad genética que existe entre los aislados de VEEE SA pertenecientes al linaje III. Los VEEE tienen mutaciones frecuentes similares a la reportada en otras poblaciones heterogéneas de virus ARN. Esta población de virus heterogéneos, se llaman cuasi especies derivadas de sus divergencias genéticas, por errores de la transcriptasa reversa que acompañan a la replicación del genoma de ARN (Steinhauer y Holland, 1987; Holland *et al.*, 1992). La diversidad es mantenida por los niveles de cuasi especies, efectos de presión de mutación (generando diversidad) vs. presión selectiva (limita la diversidad) en la población (Domingo y Holland, 1988; Weaver *et al.*, 1993). Aunque la alta frecuencia de mutación de los virus ARN provee un mecanismo potencialmente rápido de evolución, estos virus pueden ser generalmente estables en la naturaleza y durante la replicación *in vitro* bajo ciertas condiciones. El VEEE y otros arbovirus tienen una tasa baja de mutaciones en relación con otros virus ARN (Weaver *et al.*, 1992). Las razones de la relativa tasa baja de mutaciones en la secuencia del ARN de los arbovirus no es clara, varias hipótesis han sido propuestas. Una posibilidad es que los Alfavirus replican con una polimerasa ARN de alta fidelidad, resultando en una relativa menor frecuencia de mutación que otros virus ARN y la conservación genética es mantenida vía selección natural. Otras hipótesis mantienen que los Alfavirus generan diversidad genética por la alta frecuencia de mutación, pero la conservación genética es mantenida vía selección natural u otros factores genéticos de la población (Weaver *et al.*, 1993).

En el árbol filogenético (Figura 2) los aislados EE VE76 EL DELIRIO y EE VE02 EL PAO se encuentran dentro del clado IIIA y tienen 97,18% de identidad en sus secuencias nucleotídicas. Estas cepas fueron aisladas en los años 1976 y 2002, y en regiones geográficas diferentes estados Zulia y

Cojedes, respectivamente. Esto sugiere que existen nichos virales de VEEE venezolanos que se conservan o mantienen sus genomas en el tiempo, por una fuerte presión de selección, es decir, se podría considerar una hipótesis de adaptación ambiental. Esta hipótesis predice una fuerte selección debido a que los ciclos de transmisión para los arbovirus ocurren en hospederos distintos (vertebrados e invertebrados). Existen resultados similares en la literatura (Weaver *et al.*, 1992; Cooper y Scoott, 2001). La presencia de selección por parte del hospedero específico, limita la evolución viral por imposición de ventaja adaptativa en relación a hospederos alternos (Strauss y Strauss, 1986). Bajo este esquema, las poblaciones virales están continuamente replicándose entre dos hospederos diferentes, crecen bien y mantienen alta ventaja adaptativa en ambos sistemas. Estos datos sugieren que posiblemente el ancestro del clado IIIA estuvo circulando desde 1976 hasta 2002. En el árbol filogenético también se observa que dos aislados del estado Zulia (EE VE76 EL DELIRIO y EE VE75 CATATUMBO), pertenecen a clados diferentes IIIA y IIIB. Estas cepas fueron aisladas en diferentes hospederos: caballo (foco epizootico) y hámster (foco enzoótico), pero en años muy cercanos (1976 y 1975) y en la misma localidad del Catatumbo, estado Zulia. Este resultado sugiere que algunas poblaciones virales de VEEE SA, dentro de algunos focos, sufren evolución independiente por uno o varios años. Weaver *et al.* (1993), señalan que poblaciones virales heterogéneas pueden competir en varios niveles: 1) Por competencia directa, la cual puede ocurrir durante la replicación de dos genotipos dentro de un hospedero o células hospederas cuando estos últimos son limitantes, 2) Por competencia indirecta de cuasi especies virales dentro de hospederos diferentes a una velocidad o eficiencia de transmisión para nuevos hospederos durante los ciclos de amplificación, 3) Las cuasi especies dentro de focos de transmisión diferentes pueden competir siguiendo un foco disperso a uno común ó por colonización de nuevos hábitats y 4) La selección de grupos puede ocurrir en respuesta a factores de transmisibilidad relacionados con la susceptibilidad del hospedero. La transmisión de estos focos de VEEE desde 1975 hasta el 2002, se ubicaron en la región Nor-Oeste-Central de Venezuela y estas áreas geográficas se relacionan con la presencia permanente de aguas estancadas: como embalses, pantanos,

lagunas, ciénagas, asociadas con aves (hospederos amplificadores) y mosquitos originando infección y pequeños brotes. El árbol filogenético obtenido es representativo de la divergencia constante de estos virus a través de su evolución histórica. Los árboles con secuencias de genes (regiones codificantes), de estudios previos, pueden ser más exactos y precisos, debido a la información reportada y por el gran número de nucleótidos analizados. Sin embargo, la secuencia parcial de la región 3' no traducible, que es una región no codificante, aportó información sobre la relación y la distancia entre las variantes NA y SA y subtipos relacionados.

CONCLUSIONES

Se encontró variabilidad genética en la región 3' no traducible entre las cepas autóctonas, mostrando más similitud con la variante SA de Perú (PE-0,0155 del linaje III) que con la variante NA de EEUU (PE-6 del linaje I). Los aislados venezolanos se agruparon dentro del linaje II-III de la variante SA mostrando una tendencia mayor hacia el linaje III, el cual se divide en dos subclados: IIIA y IIIB. Ubicándose la cepa EE VE02 EL PAO junto con EE VE76 EL DELIRIO en el clado IIIA y las otras cepas venezolanas en el clado IIIB.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del Laboratorio de Arbovirus, Sanidad Animal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP-INIA) por el suministro de las cepas de VEEE. Este estudio se llevó a cabo utilizando aportes del proyecto de Misión Ciencia N° 2008000911-1.

REFERENCIAS

Acha, P.N.; Szyfres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2nd ed., Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Washington, DC, 503:313-334.

Aguilar, P.V.; Robich, R.M.; Turell, M.J.; O'Guinn, M.L.; Klein, T.A.; Huaman, A.; Guevara, C.; Rios, Z.; Tesh, R.B.; Watts, D.M.; Olson, J.; Weaver, S.C. 2007. Endemic eastern equine encephalitis in the Amazon region of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76:293-298.

76:293-298.

Aguilar, P. V.; Leung, L.W.; Wang, E.; Weaver, S.C.; Basler, C.F. 2008. A five-amino-acid deletion of the eastern equine encephalitis virus capsid protein attenuates replication in mammalian systems but not in mosquito cells. *J. Virol.*, 82:6972-6983.

Brault, A. C.; Power, A.M.; Chavez, C.L.; López, R.; Chacón, M.; Gutiérrez, L.F.; Kang, W.; Tesh, R.B.; Shope, R.E.; Weaver, S.C. 1999. Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central and South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61:579-568.

Cooper, L.; Scott, T. 2001. Arbovirus host-specific evolution differential evolution of eastern equine encephalitis virus populations in response to host cell type. *Genet.*, 157:1408-1412.

Dietz, W.H.; Galindo, P.; Jhonson, K.M. 1980. Eastern equine encephalomyelitis in Panama: the epidemiology of the 1973 epizootic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:133-140.

Domingo, E.; Holland, J.J. 1988. High error rates, population equilibrium, and evolution of RNA replication. In: *RNA Genet. CRC Press*, Boca Raton FL. III:211-245.

Garmashova, N.; Atasheva, S.; Kang, W.; Weaver, S.C.; Frolova, E.; Frolov, I. 2007. Analysis of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription. *J. Virol.*, 81:13552-13565.

González, M.C.; Ruíz, J.; Rivero, J.; Bermúdez, V.; Herrera, F. 2009. Caracterización del virus de la encefalitis equina del este mediante la transcriptasa reversa reacción en cadena de la polimerasa y el análisis del polimorfismo de la conformación de cadenas sencillas. *Rev. Fac. Cs. Vets.*, 50:77-84.

González, M.C. 2010. Preparación y evaluación de una vacuna inactivada contra el virus de encefalitis equina del este a partir de una cepa autóctona venezolana. Tesis de Doctorado, Postgrado en Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela, 178p.

Gould, E.A.; Coutard, B.; Molet, H.; Morin, B.; Jamal, S.; Weaver, S.; Gorbalenya, A.; Moureau, G.; Baronti, C.; Deloga, I.; Forrester, N.; Khasnatinov, M.; Grtsun, T.; de Lamballerie, X.; Canard, B. 2009. Understanding the alphavirus: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res.*, 78:37-46.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Program for Windows 95/98. *NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41:95-98.

- Holland, J. J.; De La Torre, J. C.; Steinhauer, D. A. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Current Topics Microbiol. Immunol.*, 176:1-20.
- Kinney, R.M.; Johnson, B.J.; Brown, V.L.; Trent, D.W. 1986. Nucleotide sequence of the 26S mRNA of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and deduced sequence of the encoded structural proteins. *Virology*, 152:400-413.
- Kinney, R.M.; Johnson, B.J.; Brown, V.L.; Welch, J.B.; Tesuchiya, K.R.; Trent, D.W. 1989. The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology*, 170:19-30.
- Kinney, R.M.; Pfeffer, M.; Tesuchiya, K.R.; Chang, G.J.; Roehrig, J.T. 1998. Nucleotide sequences of the 26S mRNA of the viruses defining the Venezuelan equine encephalitis antigenic complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59:952-964.
- Kondig, J.P.; Turell, M.J.; Lee, J.S.; O'Guinn, M.L.; Wasielosky, L.P. Jr. 2007. Genetic analysis of South American eastern equine encephalomyelitis viruses isolated from mosquitoes collected in the Amazon Basin region of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76:408-416.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 21:2947-2948.
- Medina, G.M. 2007. Caracterización molecular y virológica de Alfavirus americanos. Tesis de Doctorado, Doctorado En Ciencias, Mención Microbiología, Centro de Estudios Avanzados, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Venezuela. 127p.
- Moncayo, A.C.; Medina, G.M.; Kalvaatchev, Z.; Brault, A.C.; Barrera, R.; Boshell, J.; Ferro, C.; Freier, J.E.; Navarro, J.C.; Salas, R.; Siger de J.; Vásquez, C.; Walder, R.; Weaver, S.C. 2001. Genetic diversity and relationships among Venezuelan equine encephalitis virus field isolated from Colombia and Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65:738-746.
- Paessler, S.; Weaver, S.C. 2009. Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine. Suppl.*, 4:80-85.
- Platteborze, P.L.; Kondig, J.P.; Schoepp, R.J.; Wasieloski, L.P. 2005. Comparative sequence analysis of the eastern equine encephalitis virus pathogenic strains FL91-4679 and GA97 to other North American strains. *J. DNA Seq.*, 16:308-320.
- Powers, A.M.; Brault, A.C.; Shirako, Y.; Strauss, E.G.; Kang, W.; Strauss, J.H.; Weaver, S.C. 2001. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J. Virol.*, 75:10118-10131.
- Powers, A.M.; Aguilar, P.; Chandler, L.; Brault, A.C.; Meakins T.; Watts, D.; Russel, K.; Olson, J.; Vasconcelos, P.; Trassos, A.; Weaver, S.C.; Tesh, R. 2006. Genetic relationships among Mayaro and UNA virus suggest distinct patterns of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75:461-469.
- Quiroz, E.; Aguilar, P. V.; Cisneros, J.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. 2009. Venezuelan equine encephalitis in Panama and genetic diversity of etiologic viral strains. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 3: e472.
- Sambrook, J.; Russell, D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 471-553.
- Schoepp, R.J.; Glass, P.J.; Parker, M.D. 2005. Eastern equine encephalitis virus PE-6. *J. DNA Seq.*, 16:308-320.
- Sequence Analysis Software. 2007. BioEdit sequence alignment editor 7.0.9.1. Copyright, Inc. Los Angeles, California.
- Siger, J. De; Pulgar, E.; Medina, G.; Matheus, I.; Pérez, B.M. 2004. Encefalitis equina del este, cepas suramericanas I: Preparación de una vacuna inactivada y su evaluación en animales de laboratorio. *Rev. Cient. Fac. Cs. Vets.*, 14: 559-567.
- Soltis, P.; Soltis, D. 2003. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Sci.*, 18:256-267.
- Steinhauer, D. A.; Holland, J.J. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Review Microbiol.*, 41:409-433.
- Strauss, E. G.; Strauss, J.H. 1986. Structure and replication of the alphavirus genome. In "The *Togavirus and Flaviviruses*". Plenum Press, New York. pp.35-90.
- Strizki, J.M.; Repik, P.M. 1995. Differential reactivity of immune sera from human vaccines with field strains of eastern equine encephalitis virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53: 564-570.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biol. Evol.*, 24:1596-1599.
- Urdaneta, L.; Herrera, F.; Pernaleté, M.; Zoghbi, N.; Rubio-Palis, Y.; Barrios, R.; Rivero, J.; Comach, G.; Jiménez, M.; Salcedo, M. 2005. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua State, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect. Genet. Evol.*, 5:177-184.
- Walder, R.; Suarez, O.; Calisher, C.H. 1984. Arbovirus studies in the Guajira region of Venezuela: Activities of eastern equine encephalitis and Venezuelan equine

- encephalitis viruses during an interepizootic period. *Am. Socie. Trop. Med. Hyg.*, 33:699-707.
- Weaver, S.C.; Hagenbaugh, A.; Bellew, L.A.; Calisher, C.H. 1992. Genetic characterization of an antigenic subtype of eastern equine encephalomyelitis virus. *Arch. Virol.*, 127:305-314.
- Weaver, S.C.; Hagenbaugh, A.; Bellew, L.A.; Netesov, S.V.; Volchkov, V.E.; Chang, J.J., Clarke, D.K.; Gousset, L.; Scott, T.H. W.; Trent, D.W.; Holland, J.J. 1993. A comparison of the nucleotide sequences of eastern and western equine encephalomyelitis viruses with those of other alphaviruses and related RNA viruses. *Virol.*, 197:375-390.
- Weaver, S.C.; Hagenbaugh, A.; Bellew, L.A.; Gousset, L.; Mallampalli, V.; Holland, J.J.; Scott, T.H. W. 1994. Evolution of alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J. Virol.*, 68:156-169.
- Weaver, S.C.; Powers, A.M.; Brault, A.C.; Barrett, A.D. 1999. Molecular epidemiological studies of veterinary arboviral encephalitides. *Vet. J.*, 157:123-138.