

CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE MEDIANTE LA TRANSCRIPTASA REVERSA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERA Y EL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LA CONFORMACIÓN DE CADENAS SENCILLAS

Characterization of Eastern Equine Encephalitis Virus by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and Analysis of Single Strand Conformation Polymorphisms

María C. González*, Jhoanny Ruíz**, José Rivero**, Víctor Bermúdez*** y Flor Herrera**,¹

*Laboratorio Clínico, Servicio Médico de Empleados Maracay, Universidad Central de Venezuela,

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo- Sede Aragua, *Cátedra de Patología, Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela

Correo-E:flormhq@gmail.com

Recibido: 23/07/09 - Aprobado: 11/12/09

RESUMEN

El análisis de polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas (SSCP, por sus siglas en inglés) se utilizó para caracterizar regiones del genoma de tres cepas de virus de encefalitis equina del este (VEEE), aisladas de cerebros de equinos muertos. Los segmentos de ARN fueron amplificados mediante la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se analizó un fragmento de 542 pb de la región 3' no traducible del ARNm 26S y un fragmento de 532 pb del gen de la proteína no estructural P₄ (nsP₄), encontrándose que la migración de las cadenas sencillas de estos fragmentos de ADNc fueron diferentes en estos aislados virales, lo que indica que presentan polimorfismo genético en estas regiones del genoma, el cual es característico de cepas de VEEE, variantes Sur Americanas.

(Palabras clave: Caballos, virus de encefalitis equina, PCR, polimorfismo)

ABSTRACT

The single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was developed to characterize RNA segments of the genome in three strains of virus eastern equine encephalitis (EEEV), isolated from dead equine brains. The RNA segments were amplified by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The analyses of the 542 pb fragment from the 3' untranslated region of the 26S mRNA and the 532 pb fragment of the nonstructural P₄ protein (nsP₄) gene were performed. The results of the present investigation show that the migration of the single strands of the c-DNA fragments was different in these isolated viruses, which indicate genetic polymorphism in these genome regions, which is characteristic of EEEV strains from South American varieties.

(Key words: Horses, virus of equine encephalitis, PCR, polymorphisms)

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

INTRODUCCIÓN

En América, circulan los Virus de la Encefalitis Equina del Este (VEEE), de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) y de la Encefalitis Equina del Oeste (VEEO) (Ruíz, 1999). En Venezuela, circulan el VEEV y el VEEE, los cuales han sido aislados en equinos. En humanos, se ha aislado el VEEV y se han detectado sólo anticuerpos para VEEE (Siger, 1995). Los complejos de VEEE, de VEEV y de VEEO pertenecen a la familia *Togaviridae*, género *Alfavirus*, virus que causan enfermedad fatal en humanos, en équidos y en otros animales domésticos, por lo que constituyen un problema de salud pública (Garmashova et al., 2007b; Aguilar et al., 2008b; Paessler y Weaver, 2009). En los EEUU, el VEEE es el más virulento para todas las especies y la enfermedad es la más grave con una alta tasa de mortalidad (Brault et al., 1999; Gould et al., 2009). En contraste, en Sur América (SA) la transmisión, probablemente, es más frecuente, pero la enfermedad en humanos es escasa; aunque las epizootias son limitadas, la enfermedad es grave (Brault et al., 1999; Weaver et al., 1999; Zárate, 1999). En Perú, el VEEE no fue aislado en pacientes de áreas enzoóticas, solamente el 2% presentó fiebre ligera con anticuerpos (Ac) IgM y el 3% tuvo Ac neutralizantes contra este virus. Estos resultados sugieren que hay exposición en los humanos, pero no desarrollan infección aparente, ya sea por la baja infectividad o por la avirulencia de las cepas SA (Aguilar et al., 2007). Los ciclos de transmisión del VEEE en SA no han sido bien caracterizados por la baja ocurrencia de enfermedad clínica y lo limitado de datos epidemiológicos. La presencia de Ac en pequeños mamíferos y aves, sugieren que sirven como hospederos amplificadores enzoóticos (Weaver et al., 1999).

El genoma de los *Alfavirus* está compuesto de una sola cadena de ARN de sentido positivo de 11 a 12 kilobases (Weaver et al., 1994; Siger, 1995). En el extremo 5' se localizan genes que codifican 4 proteínas no estructurales (nsP₁-nsP₄). El extremo 3' es poliadenilado (poli A), tallo de largo variable, infeccioso y no se traduce a partir del ARN genómico, sino que se expresa como una molécula de ARNm subgenómico (ARNm 26S). El fragmento subgenómico de ARNm 26S codifica cinco proteínas estructurales: la C, E₁, E₂,

E₃ y el polipéptido de 6 kDa. Las dos glicoproteínas de envoltura, la E₁ (hemoaglutinina) y la E₂ (seroneutralizante), modifican la membrana, ambas contienen epítopes para los Ac neutralizantes y determinan la especificidad de serogrupo y subgrupo en los *Alfavirus*. Algunos de estos virus tienen una tercera proteína de envoltura, la E₃, como el virus Sindbis (VSIN) y el VEEV (Roehrig, 1993; Weaver et al., 1994; Machota et al., 2002). 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 (Brault et al., 1999; Kondig et al., 2007).

Se ha demostrado que la replicación de los *Alfavirus* del viejo y nuevo mundo interfiere con la transcripción de las células de mamíferos, aunque siguiendo diferentes mecanismos. Dos virus del viejo mundo, el VSIN y el virus del bosque Semliki, dependen de la proteína no estructural P₂, mientras los virus del nuevo mundo, el VEEV y el VEEE, desarrollan un mecanismo alternativo con la proteína de la cápside (Garmashova et al., 2007a). El VEEV y el VEEE regulan la respuesta celular antiviral a través de la proteína de la cápside. Aparentemente, esta función se localiza entre los aminoácidos 33-68 de la región amino terminal, la cual tiene 2 dominios con funciones diferentes, uno que interactúa con el complejo del poro nuclear y el otro con el citoplasma (Garmashova et al., 2007b). La proteína de la cápside del VEEE, es un potente inhibidor de expresión de genes en la célula huésped y esta función se encuentra en la región amino terminal. Se identificaron de 55 a 75 aminoácidos para esta función, la cual es crítica para la patogénesis de virus. VEEE mutantes con delección de 5 a 20 aminoácidos en esta región aumentaron su sensibilidad al interferón, esta condición permite un efecto antiviral (Aguilar et al., 2008b). El reemplazo del fragmento amino terminal de la proteína de la cápside reduce la citopatogenicidad y atenuación *in vivo*. Estos hallazgos pueden ser usados para diseñar vacunas vivas atenuadas o recombinantes de *Alfavirus* del nuevo mundo (Garmashova et al., 2007b).

De acuerdo a ensayos serológicos, los *Alfavirus* son agrupados en 7 complejos antigénicos; a su vez un complejo antigénico puede subdividirse en especie, subtipo y variante. El complejo antigénico de VEEE,

es una sola especie y se han distinguido dos variantes antigénicas la Norte Americana (NA) y la Sur Americana (SA) (Calisher *et al.*, 1990). La variante NA comprende aislados de Canadá, Estados Unidos e islas del Caribe y la SA aislados de Centro y Sur América, desde Panamá a Argentina. La variante SA presenta un mayor grado de diversidad antigénica que la NA. Estos resultados son comparables a los hallados utilizando otra distinción taxonómica, basada en secuencias nucleotídicas, lo cual permitió la identificación de 4 principales linajes en el complejo de VEEE. El linaje I comprende la variante NA, estos aislados son altamente conservados y difieren en 2% en su secuencia nucleotídica. Los linajes II-IV comprenden la variante SA, y presentan una considerable heterogeneidad genética con diferencias de 11 - 25% en sus secuencias (Brault, *et al.*, 1999; Weaver, *et al.*, 1999). Es decir, la variante NA tiene alta conservación genética y por ende antigénica, mientras que la SA no la tiene. Por esta razón, las vacunas producidas con la variante NA tienen poco efecto en la variedad SA (Strizki y Repik, 1995).

Estas variaciones genéticas entre NA y SA son, probablemente, responsables de las diferencias epidemiológicas, clínicas, moleculares y de patogenicidad existentes entre ambas (Walder *et al.*, 1981; Calisher *et al.*, 1990; Strizki y Repik, 1994; Weaver *et al.*, 1994; Brault *et al.*, 1999). A su vez, las diferencias en la diversidad genética entre la variante NA y SA se pueden explicar por diferencias ecológicas, por diferencias en los ciclos de transmisión enzoótica y por la mayor diversidad de vectores en el trópico (Brault *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1994; 1999). Las cepas SA avirulentas son sensibles a los interferones (IFN) *alfa*, *beta* y *gamma* humano, mientras que las cepas NA son altamente resistentes. Se han identificado genes asociados a la sensibilidad al IFN (Aguilar *et al.*, 2008a). Se han construido dos quimeras de virus con cambios en la región de los genes de las proteínas estructurales y no estructurales de la cepa NA y SA avirulenta, ambas quimeras han producido enfermedad fatal en ratones y han exhibido sensibilidad intermedia al IFN. Las proteínas estructurales y no estructurales son importantes en la virulencia del virus (Aguilar *et al.*, 2008a).

Un método sencillo, rápido y eficiente para la caracterización genética de aislados virales es el análisis del polimorfismo de la conformación

de cadenas sencillas de ADN (SSCP) (Afzal *et al.*, 1993). La sustitución de un nucleótido en un fragmento de ADN particular puede producir un cambio conformacional en las cadenas sencillas de ADN afectando su migración en electroforesis en gel de poliacrilamida. Se forman dos clases de cadena sencilla de ADN. En el caso de las cadenas sencillas renaturalizadas sobre si mismas (RSS), su migración depende del apareamiento de bases en la misma cadena, por lo que es sensible a mutaciones puntuales y en el caso de las cadenas sencillas desnaturalizadas (DSS), su migración depende de su tamaño y por tanto depende de las inserciones o deleciones de nucleótidos. El tamaño y la forma de la cadena sencilla determinan su migración (Black *et al.*, 1995; Orita *et al.*, 1989). De esta manera, se pueden distinguir diferencias en la secuencia nucleotídica, aún en una sola base en distintas regiones del ADN. Por otra parte, se pueden detectar inserciones o deleciones de nucleótidos.

Dentro de las cepas de VEEE que se caracterizaron en este estudio, ésta la cepa El Pao, la cual se utilizó como semilla de virus en la preparación de una vacuna inactivada oleosa contra el VEEE (datos no publicados), de allí la importancia de compararla con otras cepas de VEEE aisladas en el país, de manera de comenzar a tener información sobre la misma, y por otra parte saber si estos aislados virales presentaban variación genética.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar genéticamente tres cepas patógenas autóctonas de VEEE. Para ello se amplificó por RT-PCR y se realizó el análisis SSCP de dos regiones génicas del virus: la región 3' no traducible del ARNm 26S y la región del gen nsP₄.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de VEEE que se analizaron, se obtuvieron de brotes epizooticos en equinos, en el Laboratorio de Arbovirus, Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP-INIA), y fueron preservadas a - 70 °C desde su aislamiento original. Los aislados virales (Tabla 1) se adaptaron previamente a crecimiento, primero se replicaron 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

Tabla 1. Cepas de VEEE autóctonas que se identificaron y caracterizaron por RT-PCR y SSCP

Cepas de VEEE	Lugar de Aislamiento	Año de Aislamiento	Hospedero
El Pao	El Pao, estado Cojedes	2002	Equino
Las Mercedes del Llano	Las Mercedes del Llano, estado Guárico	1996	Equino
Tucacas	Tucacas, estado Falcón	1984	Equino

pases. El cultivo viral se recolectó después de los efectos citopáticos evidentes entre las 48 y 72 h de acuerdo a Brault *et al.* (1999). La extracción de ARN de cada cepa viral se realizó mediante el método fenol cloroformo con tiocianato de guanidina modificado por Urdaneta *et al.* (2005). El ARN se preservó a -80°C hasta el procesamiento del RT-PCR; la concentración del ARN obtenido se determinó por espectrofotometría a través de las mediciones de longitudes de onda correspondientes a 260 y 280 nm, obteniendo una concentración promedio de, aproximadamente $397\text{ ng}/\mu\text{L}$. En el RT-PCR se utilizaron cebadores altamente conservados para copiar y amplificar regiones específicas del genoma del VEEE para cepas de origen SA de acuerdo a Brault *et al.* (1999). El empleo de oligonucleótidos específicos a la región de interés que corresponden a las siguientes secuencias: el par de cebadores E -11660 (-) (5' GAAATATTAACAAAATA 3') y el E -11118 (+) (5' TTACCTGCAAAGGRGATTG 3') para amplificar el fragmento de 542 pb de la región 3' No Traducible y los cebadores E -7514 (-) (5' TTAGGTCAGCCGTAGAGGGT3') y el ALPHA-6982 (+) (5' GATGAAATCNGGVATGTT 3') para amplificar el fragmento de 532 pb del gen nsP₄. Se utilizó el *kit* Access RT-PCR System (Promega, EEUU) para amplificar el ADN complementario de las cepas de VEEE.

La RT-PCR fue optimizada para los cebadores E-11660 (-) y el E-11118 (+) en un volumen de reacción de $50\ \mu\text{L}$ con $1,50\ \text{pmol}/\mu\text{L}$ de cada cebador, en tampón AMV/Tfl 1X, $0,04\ \text{mM}$ de cada uno de los dNTPs, $1\ \text{mM}$ de MgCl_2 , $0,1\ \text{U}/\mu\text{L}$ de Taq Tfl, $0,1\ \text{U}/\mu\text{L}$ de TR-VMA, $0,01\ \text{U}$ de ARNsin (Promega, EEUU) para una concentración promedio de $198,33\ \text{ng}/\mu\text{L}$ de ARN. Las condiciones óptimas de la RT-PCR para los cebadores E-7514 (-) y el ALPHA-6982 (+) fue similar a la empleada para los cebadores anteriores,

con la excepción de las concentraciones de MgSO_4 y dNTPs, que se ajustaron a $0,8\ \text{mM}$ y a $0,05\ \text{mM}$, respectivamente. Para efectuar el RT-PCR se programó el termociclador (MJ Research PT-100, Inc., EEUU) con las condiciones de temperatura y número de ciclos de acuerdo a Moncayo *et al.* (2001). La mezcla de la RT-PCR para ambos pares de cebadores, se incubó para la transcripción reversa a 40°C por 20 min, seguido de 50°C por 10 min. La amplificación del ADNc se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 44°C por 30 s y extensión a 72°C por 2 min, con una extensión final de 72°C por 10 min. La amplificación de los fragmentos de ADNc se evidenció en cada caso a través de una separación electroforética en gel de agarosa al 2% durante 45 min a 70 V y revelado con bromuro de etidio. La visualización y el registro fotográfico de los productos de la RT-PCR se realizó en el equipo transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc 2000 BIORAD, Biorad, EEUU).

Seguidamente, a los productos de RT-PCR ($\sim 100\ \text{ng}$ de ADNc) se les realizó el análisis de SSCP de acuerdo a Herrera *et al.* (2006) previamente descrito por Orita *et al.* (1989). Los productos amplificados de cada cepa viral, se mezclaron con una solución amortiguadora para desnaturalización y carga en gel de poliacrilamida (NaOH $10\ \text{mM}$ / formamida 95% / azul de bromofenol 0,05% / xilencianol 0,05%). Para proceder a la desnaturalización, esta mezcla se calentó durante 10 min a 95°C en el termociclador (MJ Research PT-100, Inc., EEUU), se enfriaron rápidamente en hielo y, posteriormente, se colocaron en el gel de poliacrilamida; como patrón se colocó un marcador de tamaño de 2.500 pb. Estos productos se separaron a bajo amperaje en el aparato de

electroforesis (BASE RUNNER 200, KODAK Company, EEUU) a 4°C, primero a un voltaje de 32 mA por 30 min y luego a un voltaje constante de 8 mA por 20 h. Las diferentes conformaciones migraron en el gel dependiendo de su estructura secundaria.

Posteriormente, el gel de poliacrilamida fue teñido y revelado de acuerdo a Black *et al.* (1995), para lo cual, primero fue fijado en una solución de ácido acético al 10% por 20 min, en agitación suave y constante en una plancha de agitación. El gel fue lavado tres veces con agua ultra pura por 2 min de agitación cada vez. Para la tinción propiamente dicha, al gel se le agregó una solución colorante de nitrato de plata al 0,15% por 30 min con agitación, seguido de un nuevo lavado con agua ultra pura por 20 s en agitación. El proceso de revelado se realizó con el uso de una solución carbonato de sodio al 3%, formaldehído 0,06% y tiosulfato de sodio 0,03 mM, en agitación manual hasta que aparecieron claramente todas las bandas. Para detener la reacción de revelado, al gel se le agregó la solución fijadora de ácido acético al 3%, se dejó por 30 min en agitación, seguido de un lavado bajo las mismas condiciones anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación por RT-PCR de la región 3' no traducible del ARNm 26S y de la región nsP₄ del genoma de las de las tres cepas de VEEE, dió productos aproximados de 542 pb (Figura 1) y 532 pb (Figura 2), respectivamente. Como era de esperarse, la reacción de RT-PCR no pudo distinguir diferencias entre las tres cepas, ya que la mutación de una base no se puede detectar por PCR, se detecta por SSCP o por secuenciación.

Los productos obtenidos en la RT-PCR fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida y teñidos con plata para mostrar los perfiles de SSCP de cada cepa de VEEE (Figura 3). Los patrones de SSCP de los aislados virales fueron comparados por medición de la migración de las cadenas sencillas del ADNc con un marcador de tamaño estándar. Cada aislado viral mostró un patrón de bandas característico en los dos fragmentos de ADNc analizados. Las diferencias en la migración de las cadenas sencillas RSS sugieren que existen mutaciones puntuales y las diferencias en la migración de las cadenas DSS sugieren

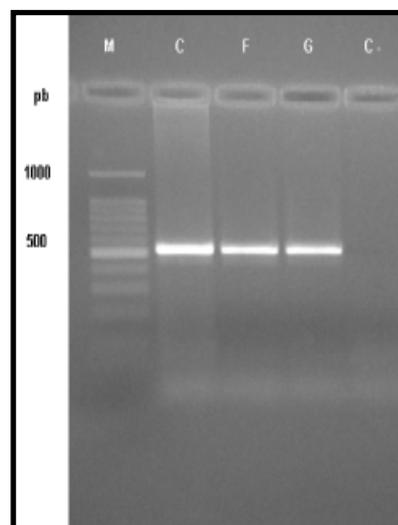


Figura 1. Amplificación por RT-PCR del fragmento región 3' No Traducible de cepas de VEEE. Cada cepa viral mostró productos amplificados de 542 pb. M = Marcador de 1000 pb, C = cepa El Pao del estado Cojedes, F = cepa Tucacas del estado Falcón, G = cepa Las Mercedes del Llano del estado Guárico y C - = Control Negativo

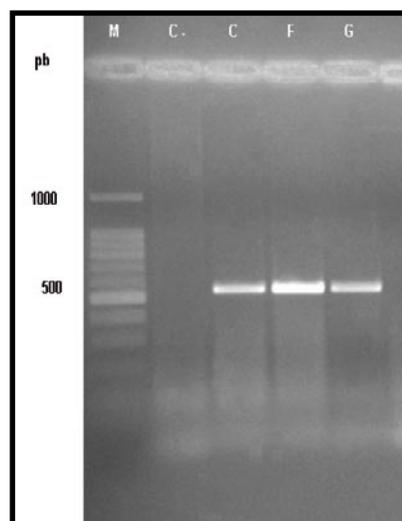


Figura 2. Amplificación por RT-PCR del fragmento región nsP4 de cepas de VEEE. Cada cepa viral mostró productos amplificados de 532 pb. M = Marcador de 1000 pb, C - = Control Negativo, C = cepa El Pao del estado Cojedes, F = cepa Tucacas del estado Falcón, G = cepa Las Mercedes del Llano del estado Guárico

que existen inserciones o deleciones de nucleótidos en las secuencias del ARN de estos virus. En consecuencia las cadenas sencillas del ADNc de las 3 cepas tienen diferentes conformaciones tridimensionales, lo que indica que existen cambios en el genoma de estos aislados virales que les confieren variabilidad genética propia de las variantes SA.

Estos resultados son similares a los señalados

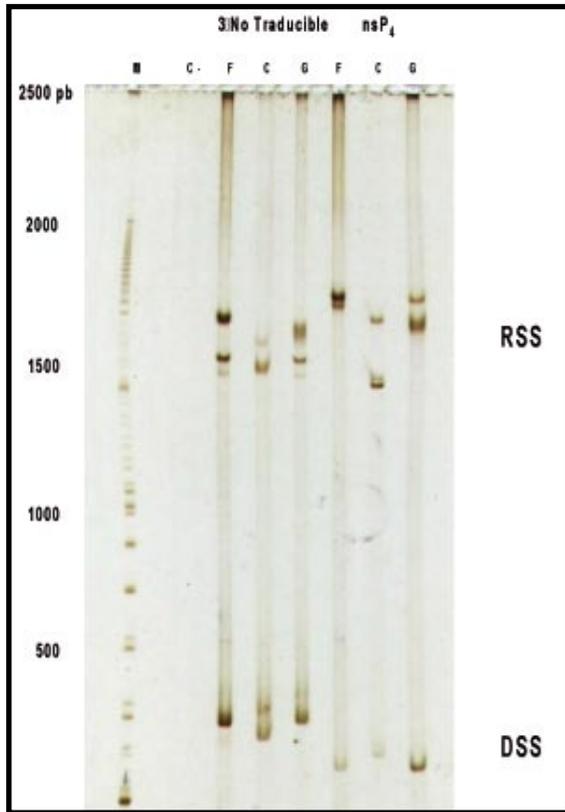


Figura 3. SSCP de secuencias de ADNc región 3' No Traducible y región nsP4 de cepas de virus de encefalitis equina del este (F = Tucacas, estado Falcón, C = El Pao, estado Cojedes y G = Las Mercedes del Llano, estado Guárico. M = Marcador de 2500 pb y C- = Control Negativo. RSS = Cadenas sencillas renaturalizadas y DSS = Cadenas sencillas desnaturalizadas

por otros autores para cepas SA. Strizki y Repik (1996) en estudios de patrones de restricción de productos obtenidos por RT-PCR de la región E₁, E₂ y de la C de variantes NA y SA, evidenciaron una marcada similitud en los patrones de restricción de las cepas NA y una gran variabilidad en los patrones de las cepas SA. Brault *et al.* (1999), Roehrig (1993), y Strizki y Repik (1996) señalaron que las cepas NA presentan conservación genética y una baja tasa de sustitución de nucleótidos y por ende conservación antigénica. En contraste, las cepas SA presentan variabilidad genética y una alta tasa de sustitución de nucleótidos, así como inserciones y deleciones nucleotídicas en sus secuencias. Estas modificaciones le confieren a las cepas SA una gran variabilidad antigénica. Brault *et al.* (1999) indicaron que una variante NA aislada en Mississippi con sólo 2 nucleótidos modificados en el gen E₂, originó que la glicoproteína E₂ tuviera un cambio en 2 aminoácidos

y a su vez esto alteró su seroreactividad. Moncayo *et al.*, (2001) detectaron en emergencias epizooticas, diversidad genética en el fragmento de 856 pb del gen P62 mediante el análisis de SSCP de aislados de VEEV de Colombia y Venezuela. Recientemente, Kondig *et al.* (2007) secuenciaron aislados virales del Perú y encontraron que la longitud del gen nsP3 es más corta, en 60 nucleótidos como mínimo, en los aislados SA que en los NA.

En este trabajo además, hay que agregar que las tres cepas de VEEE son de diferentes localidades geográficas de Venezuela y aisladas en diferentes épocas, lo que podría contribuir a magnificar el polimorfismo genético de estas cepas virales.

CONCLUSIONES

Se amplificaron por RT-PCR dos regiones del genoma viral, la región 3' no traducible del ARNm 26S y del gen nsP₄, y se determinó mediante el SSCP que estos aislados virales presentaron polimorfismo genético en estas regiones, lo cual es característico de cepas de VEEE variantes SA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Arbovirus, Sanidad Animal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP-INIA) por su colaboración en la realización de este proyecto. Este estudio se llevó a cabo utilizando equipos y materiales adquiridos a través de financiamiento del Proyecto FONACIT N°. G-2001000999.

REFERENCIAS

- Aguilar, P. V.; Adams, A. P.; Wang, E.; Kang, W.; Carrara, A. S.; Anishchenko, M.; Frolov, I.; Weaver, S. C. 2008a. Structural and nonstructural protein genome regions of eastern equine Encephalitis virus are determinants of interferon sensitivity and murine virulence. *J. Virol.*, 82:4920-30.
- Aguilar, P. V.; Leung, L. W.; Wang, E.; Weaver, S. C.; Basler, C. F. 2008b. 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.
- 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.
- Afzal, M.; Yates, P.; Forsey, T.; Minor, P. 1993. Use of single-strand conformation polymorphism technique for the inicial characterization of virus isolates. *Vaccine*, 11:1169-1170.
- Black, W.; Vanlandingham, D.; Sweeney, W.; Wasieloski, L.; Calisher, Ch.; Beaty, B. 1995. Typing of La Crosse, Snowshoe Hare, and Tahyna viruses by analyses of single-strand conformation polymorphisms of the small RNA segments. *J. Clin. Microbiol.*, 33:3179-3182.
- 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.
- Calisher, CH. H.; Karabatsos, N.; Foster, P. H.; Pallansch, M.; Roehrig, J.T. 1990. Identification of an antigenic subtype of eastern equine encephalitis virus isolated from a human. *J. Clin. Microbiol.*, 28:373-374.
- Garmashova, N.; Gorchakov, R.; Volkova, E.; Paessler, S.; Frolova, E.; Frolov, I. 2007a. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *J. Virol.*, 81:2472-2484.
- Garmashova, N.; Atasheva, S.; Kang, W.; Weaver, S. C.; Frolova, E.; Frolov, I. 2007b. Analysis of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription. *J. Virol.*, 81:13552-13565.
- 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.
- Herrera, F.; Urdaneta, L.; Rivero, J.; Zoghbi, N.; Ruiz, J.; Carrasquel, G.; Martínez, J.A.; Pernalet, M.; Villegas, P.; Montoya, A.; Rubio-Palis, Y.; Rojas, E. 2006. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101:625-633.
- 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.
- Machota, V.S.; Duran, P. S.; Yanes, M.E. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. 1^{era} edición, Mc Graw-Hill Interamericana, España, pp. 739-755.
- 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.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 86:2766-2770.
- Paessler, S.; Weaver, S. C. 2009. Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine*, Suppl. 4:80-85.
- Roehrig, J.T. 1993. Immunogens of encephalitis viruses. *Vet. Microbiol.*, 37:273-284.
- Ruiz, A. 1999. Situación de las encefalitis equinas en las Américas. En: *Encefalitis Equinas por Arbovirus*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. SAGAR, México D. F., pp. 66-78.
- Siger, J. de. 1995. Encefalitis equinas. En: *Jornadas sobre Encefalitis Equina*. Colegio de Médicos Veterinarios del estado Aragua. 1-17.
- Strizki, J.M.; Repik, P.M. 1994. Structural protein relationships among eastern equine encephalitis viruses. *J. Gen. Virol.*, 75: 2897-2909.
- 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.
- Strizki, J.M.; Repik, P.M. 1996. Coupled PCR-restriction enzyme analysis for rapid identification of structural gene relationships among strains of eastern equine encephalitis virus. *Virus Res.*, 43:69-75.
- Urdaneta, L.; Herrera, F.; Pernalet, 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.; Rossato, R.R.; Eddy, G.A. 1981. Virion polypeptide heterogeneity among virulent and avirulent strains of eastern equine encephalitis (EEE) virus. *Arch. Virol.*, 68:229-237.

- Weaver, S.C.; Hagenbaugh, A.; Bellew, L.A.; Gousset, L.; Mallampalli, V.; Holland, J.J.; Scott, TH.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.
- Zárate, A.M. 1999. Arbovirus que causan encefalitis en Norte América. En: *Encefalitis Equinas por Arbovirus. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. SAGAR, México D.F.*, pp. 87-163.