

Aspectos generales del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV)

Venezuelan Equine Encephalitis Virus(VEEV): A Review

Diana S. Vargas^{1,2}, Jairo Jaime C², Víctor J. Vera²,

¹Estudiante de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

²Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. jjaimec@unal.edu.co

Recibido: Enero 15 de 2009. Aceptado: Abril 18 de 2009

RESUMEN

El virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) pertenece a los *Alphavirus*. Es transmitido por mosquitos y es una enfermedad emergente en equinos, humanos y animales silvestres. Desde comienzos del siglo 20 se han presentado brotes de la enfermedad asociados a sintomatología neurológica tanto en equinos como en humanos. Este virus se clasifica en 6 subtipos antigénicos cada uno con variedades. Los subtipos antigénicos IAB y IC son los responsables de las principales epizootias. El origen de las epidemias se ha asociado primero al empleo de vacunas inactivadas inadecuadamente y segundo, por la evolución de cepas enzoóticas cercanas a las epizooticas como el subtipo ID. Este último, circula en el bosque húmedo tropical de la frontera Colombo-venezolana. Por lo anterior, las medidas de prevención en esta zona se han fundamentado en el control de vectores, control de la movilización en la frontera y la vacunación.

Palabras clave: *Alphavirus*, equinos, epizootico, enzoótico, Mosquitos

SUMMARY

Venezuelan equine encephalitis (VEE) belongs to the *Alphavirus* of the new world. This virus is considered an emerging disease in equines, humans and others wild animals, that is transmitted between vertebrate hosts by infected mosquitoes. Sporadic outbreaks occurred from the beginning of the 20th century caused neurological syndrome in equines and humans. VEE complex *alphavirus* are classified into six distinct antigenic subtypes each with varieties. The antigenic subtypes IAB and IC, have been responsible for all epizootics. There are two main hypotheses for the origin of epizootic VEE viruses: First, use of inadequately inactivated vaccines using epizootic VEE IAB virus and second, evolution from closely related enzootic VEE strains like subtype ID strains. This enzootic subtype circulates in tropical lowland forest between Colombia and Venezuela. Their circulating and outbreaks epidemics needs control measure, like vectors control, mobilization between borders, and vaccination with safe and effective vaccines.

Key words: *Alphavirus*, equines, enzootic, epizootic, mosquitoes

INTRODUCCION

El Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) se caracteriza por desencadenar epizootemias, las cuales han ocurrido de forma intermitente o esporádica desde 1930. Uno de los principales brotes ocurrió en la frontera colombo-venezolana en 1962 afectando un gran número de humanos y equinos. Esta epidemia abarcó más de 4000 kilómetros diseminándose en países de centro y norte América. Luego de un periodo de inactividad comprendido entre 1973 y 1992, surgieron brotes esporádicos en Venezuela, Colombia y México. La última gran epidemia ocurrió en 1995 asociado al subtipo IC, con una estimación de 75.000 casos humanos provocando 0.4% de casos fatales y 50000 casos en equinos (Rivas et al 1995, Colina et al 2003). Brotes recientes en América del Sur y en parte de Centro América confirman el papel continuo del VEEV como un patógeno re-emergente en humanos y en equinos.

CARACTERISTICAS VIRALES

Este virus pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, junto con los virus de la Encefalitis Equina del Este EEE y Encefalitis Equina del Oeste EEO. EL VEEV tiene forma icosaédrica con un diámetro entre 60 a 70nm y está constituido por una cápside rodeado de una envoltura lipoproteica (Paessler et al 2006).

El genoma del VEEV está constituido por un RNA de polaridad positiva no segmentado de 11.4 Kb. El extremo 5' presenta una secuencia de nucleótidos que imita la estructura CAP y el extremo 3' presenta cola poli A (Greene I, et al 2005). Figura 1.

Para la síntesis de proteínas, este virus al igual que otros RNA, elabora un RNAm subgenómico designado 26S, el cual es similar a la secuencia del extremo 3'. El RNA subgenómico codifica para una poliproteína, la cual es posteriormente clivada por proteasas celulares y virales en las diferentes proteínas estructurales (C de la cápside, E1 y E2) (Brault A et al 2004; Russo et al 2006).

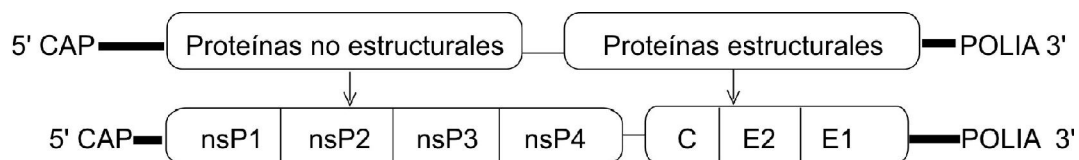


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VEEV

A diferencia de las proteínas estructurales, las proteínas no estructurales son codificadas directamente del RNAm en el extremo 5' a partir de una poliproteína denominada nsP1-4, la cual es clivada dando origen a las proteínas implicadas en proceso replicativo del virus como la nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 (Dam E, 1999; Powers et al 2001). Entre estas, la más importante es la nsP2, la cual tiene diversas funciones como ATPasa, GTPasa, helicasa, trifosfatasa, proteasa, entre otras (Russo et al 2006).

Replicación viral:

En el proceso de adhesión y penetración del virus a la célula, la proteína de la envoltura viral E2 es la que está mayormente involucrada. Varias proteínas de superficie celular se han identificado como receptores para este virus, pero ninguna se considera como diana única. Entre estas, se ha evidenciado que la laminina de alta afinidad y la lectina tipo C pueden funcionar como receptores para la infección de células dendríticas (Anischecko et al 2004). También se han sugerido otros posibles receptores para la E2 como el heparan sulfato presente en diferentes tipos celulares.

Luego de adherirse y penetrar en la célula huésped, el virus ingresa al citoplasma a través del proceso de endocitosis mediado por pH ácido y por efecto de este, libera su genoma. El RNA viral libre en el citoplasma actúa como un RNAm iniciando la traducción de la poliproteína no estructural, la cual luego es empleada en la síntesis de un RNA negativo intermediario (Gardner et al 2008). El genoma viral es replicado por la acción de las proteínas no estructurales junto con la RNA polimerasa dependiente del RNA (RdRp) (Petrokova O et al 2005). Estas proteínas participan en la síntesis de antígenomas complementarios de sentido negativo. Posteriormente, la polimerasa viral emplea esta plantilla negativa para sintetizar una molécula de RNA positivo con un tamaño de 4Kb que corresponde al RNA subgenómico (Petrokova O et al 2005). La liberación de los viriones se da a través de la membrana plasmática de la que adquiere su envoltura, entre 6 a 8 horas después de que el virus a penetrado a la célula (Brien L. 2007)

VARIABILIDAD ANTIGENICA

Las diferencias antigénicas, principalmente las encontradas a nivel de la gpE2, han permitido clasificar al VEEV en 6 subtipos antigénicos y cada de ellos presenta variantes (Wang et al 1999). Los subtipos virales II al VI, así como las variantes D, E y F del subtipo I no se han asociado con las grandes epidemias o epizootias equinas. Estas circulan continuamente entre roedores y mosquitos y son conocidas como cepas enzooticas (Anischecko M et al 2004). A diferencia de las anteriores, las variedades AB y C del subtipo I son consideradas epizooticas y epidémicas debido a que han provocado grandes brotes en equinos y en humanos (Brault A, et al 2004). Así mismo, aislamientos de brotes recientes en México y Brasil, han permitido identificar los subtipos enzooticos IE y IF como causantes de enfermedad en equinos y humanos (Camera A, et al 2003; Estrada et al 2004).

El origen de cepas epizootodémicas aun es un misterio. Algunos brotes presentados al inicio del siglo probablemente fueron originados por el empleo de vacunas mal inactivadas. Así mismo, la hipótesis

de modificaciones genéticas no se descarta, debido a que los virus RNA como el EEEV son propensos a mutaciones y recombinaciones. Se ha establecido que gran parte de las mutaciones emergen durante el cambio de huéspedes (Green I, 2005). Las mutaciones son encontradas principalmente en la gp de la envoltura E2 Wang et al, 2005; Powers et al, 2001). La habilidad de generar mutantes de los virus ha permitido que estos puedan adaptarse rápidamente a las respuestas del huésped, evadir los mecanismos inmunes, alterar la unión del virus a la célula y modificar su virulencia generando variantes patógenas para el hombre y el equino.

Análisis filogenéticos entre cepas han permitido establecer un modelo de emergencia epidémica a partir de cepas enzooticas. Estos análisis han revelado una cercana relación genética (aprox. 99% de homología entre nucleótidos) entre algunas cepas, como las de los subtipos IC y ID, las cuales circulan en la frontera colombo venezolana (Navarro J et al 2005; Wang E et al 1999). Por otro lado, para establecer el fenotipo viral y determinar si una cepa es epizootica existen criterios como: la habilidad de producir una elevada mortalidad, viremias graves en los equinos, grados variables de virulencia en las diferentes especies, resistencia al interferón alfa/beta por las cepas epizooticas, entre otros (Anishchenko M et al 2004; Kinney et al 1998).

Características del ciclo Epidemiológico:

EL VEEV existe en dos formas epidemiológicas: virus enzooticos y epizooticos. Estos tienen ciclos de amplificación que involucran vertebrados silvestres (roedores y aves principalmente) y mosquitos, quienes transmiten la infección de animales virémicos a susceptibles. Una vez que los mosquitos adquieren el patógeno, dentro de ellos el virus se replica en las células epiteliales del intestino medio y posteriormente, se dirige a las glándulas salivares donde permanece para ser transmitido (Petrokova O 2005; Smith et al 2008). Algunas especies de mosquitos son más susceptibles a cepas enzooticas que epizooticas. Estas diferencias obedecen a las mutaciones que ocurren en el principal determinante de la infección: la gp E2, la cual altera su afinidad por los receptores de las células epiteliales (Smith et al 2008).

Tipos de ciclo:

Ciclo selvático o enzoótico: Las variantes enzoóticas del virus se mantienen en el ambiente a niveles bajos, conservando una actividad continua y permaneciendo por periodos de tiempo indefinidos en las selvas húmedas tropicales y subtropicales. Son generalmente incapaces de alcanzar altos niveles de replicación viral y causar brotes, a excepción de la variante IE, la que ha ocasionado brotes en equinos. La transmisión se realiza a través del paso desde los roedores a un número variado de mosquitos principalmente del genero *Culex* (*Melanoconion*) spp. Cuando ingresan al ecosistema enzoótico, el hombre y los équidos incidentalmente se introducen en este ciclo. Estas variantes son patógenas para el humano ocasionando leve mortalidad. La variante enzoótica ID, es la que más circula en Colombia a nivel de las cuencas de los ríos Magdalena y Catatumbo, la costa Atlántica,

parte del pacífico, los llanos orientales y el Magdalena medio (Mesa et al 2005). Figura 2.

Ciclo epizootico/epidémico: Las epizootemias son causadas por las variantes AB y C del subtipo I. Estas se presentan de forma repentina, inesperada y violenta; se pueden diseminar durante años en amplias áreas geográficas afectando un gran número de équidos. Este ciclo ocurre al final de la época de lluvias, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales.. En este tipo de presentación, los équidos son los huéspedes primarios y amplificadores del patógeno. Durante las epizootias, varias especies de mosquitos han sido implicadas como vectores, una de las principales es el *Aedes taeniorhynchus* (Brault et al 2002; Smith et al 2008). Esta forma de ciclo se ha presentado en Colombia en departamentos de la Costa Atlántica, en el Valle del Magdalena y los Llanos Orientales (Mesa et al 2005). Figura 2.

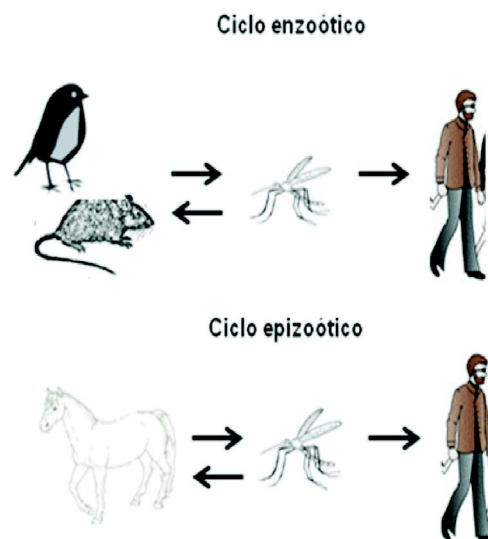


Figura 2. Representación esquemática del ciclo epidemiológico del VEEV.
Adaptado de Weaver et al. 2004.

PATOGENESIS

La infección de EEEV en equinos varía según la severidad de la misma, la cual puede resultar en infección inaparente o subclínica seguido por seroconversión; enfermedad sistémica caracterizada por taquicardia, fiebre, depresión y anorexia; y enfermedad encefalítica que en ocasiones es fatal.

Después de la picadura del mosquito, el periodo de incubación viral es de 12 a 48 horas y se puede prolongar por semanas dependiendo de la cepa. Las células blanco son las células de Langerhans y las células dendríticas, las cuales llegan a los nódulos linfáticos (Gardner et al 2008). Una vez ocurre la

infección, el virus presenta una replicación bifásica, iniciándose en los tejidos linfoides a las 4 horas p.i. y siguiendo en el sistema nervioso central SNC entre las 48 a 72 horas p.i. (Paessler 2006; Charles 1995). La infección de las células neuronales y gliales del SNC provoca una meningoencefalitis entre 7 a 10 días p.i. (Fine et al: 2008; Green et al 2005). A diferencia de la infección por aerosol, donde el virus infecta directamente las regiones olfatorias, en este caso por vía sanguínea, este puede eventualmente infectar los bulbos olfatorios, (Reed et al 2005). Se ha determinado que los anticuerpos generados por una infección persisten por meses y probablemente por años (Greene et al 2005).

DIAGNOSTICO

Existen varios métodos para el diagnóstico de la enfermedad, pero lo más importante es recopilar los datos y observaciones a nivel de campo y correlacionarlo con los resultados de laboratorio. Uno de los métodos más importantes es la detección del antígeno mediante el aislamiento viral a partir de suero o fluido espinal tanto de humanos y animales. Este virus desarrolla efecto citopático EC entre 24 a 48 horas posinfección en líneas celulares de mamíferos y aves, a diferencia de líneas celulares de mosquitos las cuales permanecen persistentes o infectadas crónicamente durante muchos pasajes sin evidenciar ningún tipo de EC (Petrokova et al 2005). La detección de Acs específicos se realiza mediante pruebas serológicas como la neutralización viral (SN) y el ELISA de captura. La SN presenta alta especificidad para detectar anticuerpos de arbovirus y es considerada el método de diagnóstico de referencia. El ELISA de captura emplea anticuerpos monoclonales (MAbs) para inmovilizar un anticuerpo en particular como la IgM (Camara A et al 2003; Wang et al 2005). Así mismo, el diagnóstico de las encefalitis virales mediante la detección del genoma a través de la PCR empleando muestras de líquido cerebroespinal ha generado buenos resultados (Kenedy 2004).

En el caso de las epizootias, la mortalidad en equinos puede llegar al 83%, mientras que para el caso de los humanos es baja (<1%) (Green et al 2005). En estos últimos, la infección es similar a un resfriado, y la presentación neurológica se desarrolla en aproximadamente 4-14% de las infecciones. Esta forma se reporta principalmente en niños y adultos mayores (Paredes et al 2003). La sintomatología neurológica consiste en ataxia, depresión y convulsiones (14% de los casos) (Wang et al 1999). Adicionalmente, se debe tener presente que las cepas de EEV son altamente infecciosas por aerosoles, convirtiéndolas en potenciales armas biológicas. Por lo anterior, es clasificada por el centro de control de enfermedades en la categoría de riesgo B.

Para determinar el potencial de una cepa circulante para causar epidemia, es importante la identificación del subtipo viral y de la variedad de anticuerpos generados en los huéspedes. El método disponible para diferenciar entre anticuerpos enzoóticos o epizoóticos es la técnica de neutralización de reducción en placa (Prats). Sin embargo, debido a la similitud de los dominios neutralizantes entre las variedades ID/IE e IAB/IC el grado de neutralización cruzada es muy alta lo que dificulta el diagnóstico final. Para sobrellevar estos problemas, se ha desarrollado una ELISA de bloqueo de epítopes, el cual distingue entre infecciones con variedades enzoóticas ID/E/F y variedades epizoóticas IAB/IC. (Wang et al 2005).

Uno de los métodos más empleados para la caracterización de los diferentes aislamientos de EEV es el polimorfismo conformacional de una sola banda (SSCP). Este método consiste en medir la migración del DNA de banda sencilla de varios aislamientos y comparar los patrones de bandeo del DNA (Moncayo et al 2001; Hayiski 1991).

PREVENCIÓN Y CONTROL

Las medidas de control van dirigidas a limitar o disminuir la presentación de epidemias. Se fundamentan en la implementación de bioseguridad; así como, en mejorar la inmunidad mediante el empleo de vacunas. Entre las medidas de bioseguridad se recomienda: control de la movilización de equinos y poblaciones humanas de sitios endémicos, control de las densidades de mosquitos mediante educación a la población, destrucción de reservorios de mosquitos mediante el empleo de químicos.

Para mejorar la inmunidad se han empleado vacunas atenuadas en pasajes celulares, como la TC83. Los resultados indican que de más 8000 individuos que recibieron este inmunógeno, entre el 20 al 40 % desarrollaron efectos adversos (Pittman et al 1996; Phillpotts et al 2002). Posteriormente, una versión inactivada con formalina de la vacuna TC83, la C-84 se implementó. Con esta, para generar y mantener una respuesta inmune efectiva y duradera, se requieren varias inmunizaciones (Paeesler S et al 2006). Si bien estas vacunas han sido empleadas ampliamente para inmunizar caballos y para proteger personal de laboratorio (Brien L 2007), su

seguridad y eficacia aun es materia de estudio (Paeesler S et al 2006). En la actualidad, se ha desarrollado una vacuna viva atenuada mediante la inducción de mutaciones sitio dirigidas en la región que codifica para gp E2 y E1. Esta vacuna conocida como la V3526, evidenció seguridad y eficacia en hamsters, ratones y primates. Aun falta probar su eficacia en equinos y humanos (Rao V et al 2004, HArt M et al 2000; Turrel et al 2008).

La falta de vacunas disponibles para humanos ha llevado a la búsqueda de nuevas metodologías como las vacunas recombinantes. Estas vacunas emplean un vector que permite la eficiente expresión y presentación de antígenos para generar una potente inmunidad humoral y celular. De esta manera, se están desarrollando virus quiméricos, empleando como vector un alphavirus humano no patógeno, el virus Sindbis. Este vector expresa todas las proteínas estructurales de la cepa TC83. (Paeesler et al 2003). Igualmente, el empleo del RNA de interferencia (siRNA) para inhibir la expresión de genes como terapia antiviral también se ha comenzado a estudiar, debido a sus éxitos contra virus como influenza, ebola y parainfluenza (Brien 2007).

DISCUSIÓN

La clasificación del EEV se ha basado en sus características antigénicas, su comportamiento biológico, su distribución geográfica, entre otras. De esta manera existen 6 subtipos cada uno con sus variantes. A pesar de que el origen de las cepas epizooticas aun sea un misterio, la hipótesis del surgimiento a partir de mutaciones de cepas enzooticos se asemeja más a la realidad. Si bien, la hipótesis de vacunas mal inactivadas puede explicar las epizootias causadas por subtipo IAB, no explica el origen de epizootias causadas por subtipo IC, el cual no se ha empleado para el desarrollo de vacunas. De esta manera, es importante establecer el número mínimo de mutaciones necesarias para generar el fenotipo epizootico responsable de las grandes epidemias

y predecir la frecuencia en la cual pueden ocurrir futuros brotes.

La vigilancia epidemiológica constante para el VEEV en países de América latina con regiones tropicales y subtropicales es esencial para disminuir su impacto negativo tanto económico como social. Este impacto está relacionado con los elevados costos en tratamientos a personas y animales, en la implementación de las campañas educativas, en el control de vectores, entre otros. Esto sin mencionar los costos ocasionados por la disminución en la producción de los animales enfermos. Por todo lo anterior, estos países deben contar con una infraestructura adecuada para la realización de actividades en prevención, vigilancia y diagnóstico oportuno.

Debido a los problemas con las vacunas existentes como la limitada protección contra las diferentes cepas, el porcentaje alto de individuos sin respuesta

y presentación de efectos colaterales, se está en la búsqueda de vacunas seguras y confiables para la inmunización en humanos y para evitar la presentación de epidemias.

REFERENCIAS

- Anishchenko M, Bowen RA, Paessler S, Austge L, Greene IP, Weavers SC. Venezuelan encephalitis emergence mediated by a phylogenetically predicted viral mutation. PNAS. 2006; 103: 4994-4999.
- Anishchenko M, Paessler S, Greene I, Aguilar P, Carrara A, Weaver S. Generation and characterization of closely related epizootic and enzootic infectious cDNA clones for studying interferon sensitivity and emergence mechanisms of Venezuelan. J Virol. 2004; 78: 1-8.
- Brault AC, Powers AM, Ortiz D, Estrada-Franco JG, Navarro R, Weaver SC. Venezuelan equine encephalitis emergente: Enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. PNAS. 2004; 101: 11344-11349.
- Brault A, Powers A, Holmes E, Woelk C, Weaver S. Positively charged amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein are associated with the emergence of Venezuelan equine encephalitis virus. J Virol. 2002; 76: 1718-1730.
- Brien L. Inhibition of multiple strains of Venezuelan equine encephalitis virus by a pool of four short interfering RNAs. Antiviral research 2007; 75: 20-29.
- Camara A, Díaz G, Vega V, Basualdo M, Contigiani M. Seroprevalence of antibodies to Venezuelan equine encephalitis complex (subtypes IAB and VI) in humans from General Belgrano Island, Formosa, Argentina. Rev Inst Med Trop. S Paulo. 2003; 45: 201-204.
- Charles P, Walters E, Margolis F, Johnston R. Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. Virology 1995; 208: 662-71.
- Colina B, Blanchard G. Encefalitis equina venezolana. Perfil clínico epidemiológico de la epidemia ocurrida en 1995. Kasmara 2003; 31: 32-38.
- Dam E, Flint M, Ryan M. Virus-encoded proteinases of the *Togaviridae*. Journal of General Virology 1999; 80: 1879-1888.
- Estrada J, Navarro R, Freier J, Cordova D, Clements T, Moncayo A, Kang W, Gomez C, Rodríguez G, Ludwig G, Weaver S. Venezuelan equine encephalitis virus, southern Mexico. Emerging infectious diseases. 2004; 10: 2113-2119.
- Fine D, Roberts B, Teehee M, Terpening S, Kelly C, Baker D, Bowen R. Venezuelan equine encephalitis virus vaccine candidate (V3526) safety, immunogenicity and efficacy in horses. Vaccine 2007; 25: 1868-76.
- Gardner C, Burke C, Tesfay M, Glass P, Klimstra W, Ryman K. Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their infectivity for dendritic cells and macrophages: The impact of altered cell tropism on pathogenesis. J Virol doi. 2008; 10.128.
- Greene I, Paessler S, Anishchenko M, Smith D, Brault A, Frolov I, Weaver SC. Venezuelan equine encephalitis virus in the guinea pig model: Evidence for epizootic virulence determinants outside the E2 envelope glycoprotein gene. Am J Trop Med Hyg. 2005; 72: 330-338.
- Greene IP, Paessler S, Austgen L, Anishchenko M, Brault AC, Bowen RA, Weaver SC. Envelope glycoprotein mutations mediate equine amplification and virulence of epizootic Venezuelan equine encephalitis Virus. J Virol. 2005; 79: 9128-9133.

Guzman H, Ding X, Xiao S, Tesh R. Duration of infectivity and RNA of Venezuelan equine encephalitis, west nile, and yellow fever viruses dried on filter paper and maintained at room temperature. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72: 474-477.

Hart M, Caswell-Stephan K, Bakken R, Tammariello R, Pratt W, Davis N, Jonhson R, Smith J, Steele K. Improved mucosal protection against Venezuelan equine encephalitis virus is induced by the molecular defined, live attenuated V3526 vaccine candidate. *Vaccine* 2000;18: 3067-3075.

Hayashi K. 1991. Pcr-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR methods Appl* 1: 34-38.

Kennedy PG. Viral encephalitis: Causes, differential diagnosis, and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 2004;75: 110-115.

Kinney R, Pfeffer M, Kyotaka R, Gwong J, Roehrig J. Nucleotide sequences of the 26S mRNAs of the viruses defining the Venezuelan equine encephalitis antigenic complex. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 952-64.

Kinney R, Tsuchiya K, Sneider J, Trent D. Genetic evidence that epizootic Venezuelan equine encephalitis (VEE) viruses may have evolved from enzootic VEE subtype I-D virus. *Virology* 1992; 191: 569-580.

Moncayo A, Medina G, Kalvatchev Z, Brault A, Barrera R, Boshell J, Ferro C, Weaver S. Genetic diversity and relationships among Venezuelan equine encephalitis virus field isolates from Colombia and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65: 738-46.

Navarro J, Medina G, Vasquez C, Coffey L, Wang E, Suárez A, Biord H, Salas M, Weaver S. Postepizootic persistence of venezuelan equine encephalitis virus. *Venezuela. Emerging infectious Disease.* 2005;11:1907-1916.

Paessler S, Haolin Ni, Petrakova O, Fayzulin R Z, Yun N, Anishechenko M, Weaver S C, Frolov I. Replication and clearance of Venezuelan equine Encephalitis Virus from the brains of animals vaccinated with chimeric SIN/VEE viruses. *J Virol.* 2006; 80: 2784-2796.

Paredes A, Alwell-Warda K, Weaver S, Chiu W, Watowich S. Structural of isolated nucleocapsides from Venezuelan Equine Encephalitis virus and implications for assembly and disassembly of enveloped virus. *J Virol.* 2003;77: 659-664.

Paessler S, Fayzulin R, Anishchenko M, Greene I, Weaver S, Frolov I. Recombinant Sindbis/Venezuelan Equine Encephalitis virus is highly attenuated and immunogenic. *J Virol*; 2003;77: 9278-86.

Petrakova O, Volkova E, Gorchakov R, Paessler S, Kinney R M, Frolov I. Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in mammalian cells. *J Virol.* 2005;79: 7597-7608.

Phillipotts R, Jones L, Howard S. Monoclonal antibody protects mice against infection and disease when given either before or up to 24 hours after airborne challenge with virulent Venezuelan equine encephalitis equine.. *Vaccine* 2002;20: 1497-1504.

Pittman P, Makuch R, Mangiafico J, Cannon T, Gibbs P, Peters J. Long term duration of detectable neutralizing antibodies after administration of live-attenuated VEE vaccine and following booster vaccination with inactivated VEE vaccine. *Vaccine* 1996; 4:337-43.

Powers A, Brault AC, Shirako Y, Strauss E, Kang W, Strauss JH, Weaver SC. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol.* 2001;75:10118-10131.

Powers A, Oberste M, Brault A, Rico R, Schumura S, Smith J, Weaver S. Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J Virol* 1997;71: 6697-6705.

- Reed D, Lind C, Sullivan L, Pratt W, Parker M. Aerosol infection of cynomolgus macaques with enzootic strains of Venezuelan equine encephalitis viruses. *The journal of infectious diseases* 2004;189: 1013-1017.
- Rao V, Hinz M, Roberts B, Fine D. Environmental hazard assessment of Venezuelan equine encephalitis virus vaccine candidate strain V3526. *Vaccine* 2004;22: 2667-73.
- Reed D, Lind C, Lackemeyer M, Sullivan L, Pratt W, Parker M. Genetically engineered, live, attenuated vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with a virulent IE strain of Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine*; 2005;23: 3139-47.
- Riemenschneider J, Garrison A, Geisbert J, Hevey M, Lee J, Ruff A, Ivins B. Comparasion of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* 2003;21: 4071-80.
- Rivas F, Díaz L, Cardenas V, Daza E, Bruzo L, Alcalá A, Boshell J, Calderon L, Ludwig G, Tsai T. Epidemia Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia 1995. *J Infect Dis* 1997;175: 828-832.
- Russo A, White M. The cristal structure of the venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 proteasa. *Strucutre* 2006;14:1449-58.
- Saikh K, Lee J, Kissner T, Dyas B, Ulrich R. Toll-like receptor and cytokine expression patterns of CD56 T cells are similar to natural killer cells in response to infection with Venezuelan equine encephalitis virus repicons. *The journal of infectious disease*; 2003;188: 1562-1570.
- Smith D, Adams P, Kenney J, Wang E, Weaver S. Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: Infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology* 2008; 372: 176-186.
- Smith D, Carrara A, Aquila P, Weaver S. Evaluation of methodos to assess transmission potential of Venezuelan equine encephalitis virus by mosquitoes and estimation of mosquito saliva titers. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73: 33-39.
- Spotts D, Reich R, Mohammed A, Kinney R, Roehrig J. Resistance to alpha/Beta interferons correlates with the epizootic and virulence potencial of Venezuelan equine encephalitis. *J Virol.* 1998;72: 10286-10291.
- Strauus J. Alphaviruses. *Microbiol Rev* 1994;58; 491-562.
- Turrel M, Parker M. Protection of HAMsters by Venezuelan Equine Encepjalitis Virus candidate vaccine V3526 againts letal challenge by mosquito bite and intraperitoneal injection. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78: 328-333.
- Wang E, Barrera R, Boshell J, Ferro C, Freier JE, Navarro JC, Salas R, Vasquez C, Weaver SC. Genetic and phenotypic changes accompanying the emergence of epizootic subtype IC Venezuelan Equine Encephalitis Viruses from an enzootic subtype ID progenitor. *J Virol* 1999; 73: 4266-4271.
- Wang E, Paessler S, Aguilar P, Smith D, Coffey L, Pfeffer M, Olson J, Blair P, Guevara C, Estrada J, Weaver SC. A novel, rapid assay for detection and differentiation of serotype-specific antibodies to venezulan equine encephalitis complex alphaviruses. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72: 805-810.
- Weaver S, Barret A. Typical mechanism of arboviral emergence. *Nature Reviews Microbiology* 2004;2:789-801.