
MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA OLEOSA CONTRA ESTOMATITIS VESICULAR BIVALENTE

IMPROVEMENT OF OIL VESICULAR STOMATITIS BIVALENT VACCINE PRODUCTION

Gustavo Arbeláez¹, Néstor Mondragón², Clara Turriago²,

Nelson Mora², María Méndez²

¹ *Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana,
Cra. 7 N° 43 - 82, Bogotá, Colombia*

² *Empresa Colombiana de Productos Veterinarios Vecol S.A., Bogotá
garbela10@yahoo.com*

Resumen

El presente estudio calculó diferentes MI (Multiplicidad de Infección) para la producción de cultivos industriales de virus de Estomatitis Vesicular (EV) y evaluó el efecto de la cantidad de glicoproteína G en la inducción de respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el virus de EV en cobayos inmunizados con una vacuna oleosa bivalente (Indiana (I) y New Jersey (NJ)). Al establecer el MI más eficiente se logró mejorar la cinética de infección de los cultivos industriales disminuyendo los tiempos de cultivo y mejorando los títulos infectantes. Adicionalmente se encontró que títulos de anticuerpos neutralizantes de cobayos inmunizados con vacuna de EV conteniendo aproximadamente 5 microgramos de glicoproteína G de cada serotipo fueron de $3.66 \log_{10}$ para I y $4.06 \log_{10}$ para NJ, los cuales se correlacionan con títulos de protección en bovinos. De este estudio se puede concluir que al seleccionar un mejor MI se puede hacer más eficiente el proceso de producción de cultivos virales industriales de EV y que la formulación de una vacuna contra estomatitis vesicular a partir de la cuantificación de la glicoproteína G puede ser una metodología de gran utilidad en la producción industrial de vacunas de buena calidad.

Palabras clave: estomatitis vesicular, glicoproteína G, Indiana, New Jersey, vacuna.

Abstract

This experiment assess different MI for Vesicular Stomatitis VS virus industrial culture production and evaluated the effect of glycoprotein G concentration in relation to antibodies induction against VS on guinea pigs vaccinated with oil bivalent vaccine (Indiana I and New Jersey NJ). With efficient MI it was possible to get better kinetic of infection at industrial cultures, reducing time of culture and improving viral titers. In addition, it was found that neutralizing titers of guinea pigs immunized with an EV vaccine containing 5 micrograms of glycoprotein G, were $3.66 \log_{10}$ for I and $4.06 \log_{10}$ for NJ, which are correlated to protection titers in cattle. About this study can be concluded that selecting a superior MI, efficiency of industrial VE virus production can be improved; on the other hand, glycoprotein G quantification methodology can be useful for a good quality VS Vaccine industrial manufacture.

Key words: glycoprotein G, Indiana, New Jersey, vesicular stomatitis, vaccine.

INTRODUCCIÓN

La Estomatitis Vesicular (EV) es una enfermedad viral que afecta a los bovinos, equinos y porcinos, caracterizada por la producción de vesículas y erosiones en la membrana mucosa oral o sobre la piel de los pezones o de las patas (Hanson, 1952) y se presenta en forma enzoótica en áreas tropicales y subtropicales de las Américas (Letchworth *et al.*, 1999; Arbeláez *et al.*, 1995; Afshar *et al.*, 1993). La presentación clínica de la EV es similar a la de la fiebre aftosa y únicamente el diagnóstico de laboratorio puede establecer la etiología del brote de enfermedad vesicular (Letchworth *et al.*, 1999).

El virus de la EV está clasificado en la familia *Rhabdoviridae*, género vesiculovirus, formado por un ARN no segmentado de polaridad negativa de 11 Kb que codifica la síntesis de cuatro proteínas internas estructurales denominadas proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M) y la polimerasa (L). A nivel externo está una glicoproteína de transmembrana (G) que es la responsable de inducir la respuesta inmune en los huéspedes infectados (Rose *et al.*, 2000). Existen dos serotipos virales Indiana (I) y New Jersey (NJ) los cuales son clasificados basados en los anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína G. Lo anterior es debido a que solamente hay un 50% de similitud a nivel de aminoácidos entre la glicoproteína de I y NJ (House *et al.*, 2003). Del serotipo I se conocen tres subtipos I1 ó clásico, I2 ó Cocal e I3 ó Alagoas (Cartwright *et al.*, 1972). En Colombia se presentan los serotipos NJ e I1 (Arbeláez *et al.*, 1995). El serotipo NJ es considerado más importante desde el punto de vista económico ya que causa la mayoría de los casos clínicos y se ha observado que la patogenicidad es mayor que la causada por el serotipo I (Bridges *et al.*, 1997).

La glicoproteína G juega un papel esencial en la infección viral ya que está involucrada en la adhesión del virus a la membrana celular y la posterior fusión, pH-dependiente entre la envoltura viral y la membrana del endosoma, lo cual conduce a la liberación de la ribonucleoproteína en el citoplasma (Matlin *et al.*, 1982).

La EV fue diagnosticada por primera vez en Colombia en el departamento del Huila en 1929 y hacia 1969 se extendió a gran parte del territorio nacional (Arboleda y Trujillo, 2002). Durante el primer semestre del año 2007 en Colombia se reportaron 22 casos de EV I y 179 casos de EV NJ, lo cual muestra un incremento significativo en comparación con lo reportado en todo el año 2006 (3 casos de EV I y 162 casos de EV NJ). Los departamentos más afectados son en su orden: Antioquia, Santander, Santander del Norte, Boyacá y Caldas; 21 de los 32 departamentos de Colombia reportaron al menos un caso durante el primer semestre de 2007 (ICA, 2007).

Colombia es el país más afectado por la EV en Sudamérica y cada año se reportan cientos de brotes de la enfermedad, y el grupo más vulnerable son las vacas de ordeño, las cuales presentan lesiones vesiculares en la boca y en los pezones, repercutiendo en la producción de leche con pérdidas económicas considerables (Abad *et al.*, 1986; Orrego *et al.*, 1988).

Durante varios años el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), ha venido investigando sobre la obtención de inmunógenos para el control de esta enfermedad (Arbeláez *et al.*, 1989; 1988; 1982). Recientemente se obtuvieron resultados muy satisfactorios con una vacuna comercial evaluada a nivel de campo, la cual brindó una protección del 96% en vacas, novillas y terneras de una zona endémica de la enfermedad (Arbeláez *et al.*, 2003).

Actualmente los cultivos de virus de EV a nivel industrial demoran hasta 24 horas en alcanzar un efecto citopático del 97%, siendo este tiempo mayor al necesario el cual puede estar repercutiendo en la calidad del antígeno producido. Adicionalmente la formulación de vacuna contra EV es realizada con base a los resultados del título infectante previo a la inactivación viral, por lo cual no es considerado como una metodología precisa ya que la vacuna contiene virus inactivado y no vivo (*comunicación personal*).

Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo principal de este estudio fue determinar la mejor multiplicidad de infección (MI) con el fin de realizar mejoras en el proceso de producción industrial de cultivos virales de EV y evaluar la cuantificación de glicoproteína G como metodología alternativa para la formulación de vacuna industrial de óptima calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus: Se seleccionaron los virus NJ-23330 Valle/93 e I-15577 Antioquia/85, los cuales fueron estudiados y caracterizados previamente en el ICA. Estas cepas constituyen la vacuna actual contra la EV, la cual fue aprobada por el ICA con base en resultados de respuesta inmune altamente satisfactorios obtenidos en ensayos de campo en bovinos equinos y porcinos (Arbeláez *et al.*, 2003).

Cultivo viral: Se partió de un cuarto pasaje de los virus NJ e I en células BHK-21 clon 13. Se utilizaron frascos de cultivo con 250 ml de células BHK-21 resuspendidas en medio MEM (medio mínimo esencial) suplementado con suero fetal bovino al 1% y con un recuento aproximado de 3 millones de células por mililitro de medio. Se emplearon 7 frascos de cultivo para cada uno de los virus, los cuales fueron inocula-

dos con distintas dosis infectante de virus (10^{-1} - 10^{-6} Dosis infectante cultivo celular 50/mL) con el fin de determinar la Multiplicidad de Infección (MI).

Las células se dejaron en incubación a 37°C por 20 horas y se determinó el título infeccioso de cada uno de los cultivos a las 20 horas posinfección, utilizando microplacas de 96 celdas y células BHK-21 clon 13 de acuerdo a la metodología propuesta por Arbeláez *et al.* (1979). Posteriormente se seleccionaron los dos cultivos que dieron mejor título infeccioso para cada uno de los serotipos, I y NJ. Una vez obtenidos los mejores MI, se procedió a realizar escalamiento en un biorreactor con capacidad de 8 litros (Celligen Plus®, New Brunswick, USA). Se hizo un cultivo viral de cada serotipo y se tomaron muestras para titulación viral en células BHK y título Fijador de Complemento (el cual evalúa el serotipo, la calidad e indirectamente la cantidad del antígeno presente en las muestras y que consiste en enfrentar antígenos, antisueros hiperinmunes producidos en cobayos y el complemento que se extrae del suero de cobayo normal y un sistema indicador de hemólisis compuesto de glóbulos rojos de cordero y sangre entera de cordero, para detectar la presencia del antígeno, cuando se incuban las muestras a 37°C, en baño de María) a las 12, 14, 16, 18 y 20 horas posinfección. El cultivo se monitoreó cada dos horas para medición de pH y recuento celular. El virus fue cosechado entre las 18 y 20 horas posteriores a la infección una vez se detectó efecto citopático (ECP), caracterizado por redondeamiento y muerte en el 97% de las células. Al finalizar el cultivo se tomaron muestras de antígenos para control de esterilidad (CE) y fijación de complemento (FC).

Inactivación viral: Se realizó con doble adición de inactivante etilenimina binaria (BEI) a una concentración de 3 mM durante 24 horas a 26°C (Barteling, 2002). Una

vez terminado el proceso, se tomaron muestras para titulación viral por FC y para realizar la prueba de inocuidad.

Inocuidad: La inocuidad de las suspensiones de los virus se realizó en células BHK21 en monocapas cultivadas en frascos Falcon de 150 cm² de capacidad y con 48 horas de cultivo. Tres frascos se utilizaron para cada muestra, inoculando 3 ml de virus inactivado y 40 ml de medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 1%. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 horas para observar posible efecto citopático. Se realizaron 4 pasajes y se controlaron por la técnica de fijación de complemento 50% hemólisis para descartar la presencia de virus activo (OIE, 2004).

Purificación del virus de EV: Las dos muestras de las cosechas correspondientes a cada uno de los virus que dieron el mejor título infeccioso, se sometieron a purificación y concentraron mediante una serie de centrifugaciones y se tomó una cantidad suficiente de cada muestra para obtener y cuantificar la glicoproteína G, siguiendo la metodología de Yilma *et al.*, (1985) con algunas modificaciones. Brevemente, cada muestra de virus fue clarificada mediante una centrifugación a 1.000 g por 10 minutos y una segunda a 10.000 g por 90 minutos. Posteriormente cada muestra de virus se sometió a ultracentrifugación a 85.000 g por 90 minutos utilizando un colchón de glicerol al 50%. El sedimento fue resuspendido en buffer TEN (0.01 M tris pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.001M EDTA) y luego sonicado a 40 watts por 9 segundos para eliminar grumos. Posteriormente se centrifugó a 50.000 g por 90 minutos utilizando gradientes de sacarosa de 10 y 40%. La banda de virus se colectó y resuspendió en 1: 2,5 mililitro de buffer TEN y se sometió a ultracentrifugación a 150.000 g por una hora. El sedimento correspondiente al virus fue resuspendido en buffer TEN y

dializado durante la noche utilizando tris 10m M, pH 7.5 a 4 grados centígrados

Aislamiento y purificación de la glicoproteína G: La glicoproteína G fue extraída por el tratamiento de las muestras de virus purificadas de cada uno de los virus con D- octilglucósido 0.06 M con 97% de pureza a una concentración de 1 miligramo de proteína por mililitro en buffer tris 10 mM, pH 7.4 a temperatura ambiente por una hora. Otros compuestos del virus fueron removidos por centrifugación a 150.000 g por dos horas. El sobrenadante conteniendo la glicoproteína G se dializó por 24 horas a 4°C en 4 litros de tris 10 mM. La pureza de la proteína G fue examinada por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), seguida por coloración con azul brillante de Coomassie (Laemmli, 1970). La concentración de la proteína G fue determinada por el método de Bradford.

Preparación de la vacuna experimental: Una vez conocida la concentración de glicoproteína G en microgramos/ml de cada cultivo de virus, la cosecha viral inactivada, fue concentrada con ultrafiltro de 300K en cartucho (Millipore Corporation, Bedford, MA), hasta alcanzar un factor de concentración de 5 X con el fin de obtener la concentración final deseada.

Formulación de vacuna de agua en aceite (w/o): La emulsión se realizó en una proporción de 50:50 (v/v): 50% de adyuvante incompleto de Freund preparado con aceite mineral y un emulsificante y 50% de los antígenos en solución acuosa (I y NJ concentrados 5X). La emulsión se realizó pasando la mezcla de antígenos - óleo a través de un emulsificador de flujo continuo (Silverson, Waterside, CB), obteniéndose un producto estable con alta viscosidad.

Esterilidad: Una vez preparada la vacuna oleosa, se sometió a prueba de esterilidad

utilizando agar sangre, agar saboreaud, caldo tioglicolato y caldo cassoy.

Diseño experimental: La vacuna bivalente NJ e I fue ensayada en dos grupos de cobayos adultos de 500 gramos de peso corporal, utilizando 10 animales por grupo y tres cobayos control sin vacunar por grupo, todos negativos a anticuerpos contra EV. El primer grupo (A) se vacunó con 0.4 ml de vacuna y el segundo (B) con 0.2 ml, ambos por vía subcutánea.

A los 30 días posvacunación, se tomó suero de todos los cobayos, incluyendo los controles con el fin de determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes contra los dos tipos de virus utilizando la técnica de micro-neutralización en placa (Arbeláez *et al.*, 1979).

RESULTADOS

Cultivos virales: Los cultivos de I y NJ mostraron una cinética de ataque viral si-

milar, obteniéndose el mayor título infeccioso hacia las 16 horas posinfección y el mayor título fijador de complemento a las 18 horas posinfección. El título infeccioso mostró una ligera caída después de alcanzar su mayor nivel; sin embargo, el título fijador de complemento se mantuvo relativamente estable después de las 18 horas posinfección incluyendo la muestra tomada 24 horas después de la inactivación viral. En la Tabla 1 se observan los resultados de la dinámica de infección para los cultivos realizados en el biorreactor a pequeña escala, Celligen Plus ® que fueron utilizados para formular la vacuna.

Inactivación viral: Al realizar la prueba de inocuidad se observó que ninguno de los cultivos inactivados mostró señales de actividad viral (efecto citopático y/o título fijador de complemento 50%) durante los pases ciegos en monocapas de células BHK-21 clon 13 dando un resultado satisfactorio.

Tabla 1

Cinética de infección de cultivos de virus de Estomatitis Vesicular serotipos Indiana y New Jersey medida en DITC 50% (dosis infectante tejido celular 50%) y TFC 50% (título fijador de complemento 50%). La muestra de inactivado fue tomada 24 horas después de iniciar el proceso de inactivación. La prueba de DITC 50% N.A. (no aplica) para el caso del inactivado.

Horas posinfección	Cultivo de virus de estomatitis vesicular			
	Indiana		New Jersey	
	DITC 50% / ml	TFC 50% / ml	DITC 50% / ml	TFC 50% / ml
12	8.2	1:55	8.8	59
14	8.33	1:61	8.96	68
16	8.5	1:157	10.05	256
18	8.2	1:174	8.32	255
Inactivado	N.A.	1:216	N.A.	250

Purificación viral y cuantificación de glicoproteína G: Se logró la purificación de la glicoproteína G en aproximadamente 95% para I y 98% para NJ como se observa en la Figura 1.

Al realizar la cuantificación de proteína de las muestras dializadas de la glicoproteína G se obtuvieron los siguientes resultados: 513.1 microgramos/ml para la muestra de I y 591.3 microgramos/ml para la muestra de NJ. Teniendo en cuenta que de acuerdo a la electroforesis se estimó porcentaje de purificación del 98 y 95%, los resultados corregidos fueron 502.8 microgramos/ml para la glicoproteína de I y 561.7 microgramos/ml para la glicoproteína de NJ. Teniendo en cuenta que el cultivo viral inactivado fue concentrado 30X (factor de concentración 30), el valor estimado de glicoproteína

G en la suspensión viral inactivada concentrada 5X que fue utilizada para la formulación de vacunas fue de 83.8 microgramos/ml de I y 93.6 microgramos/ml de NJ.

Formulación de vacuna: el 25% de la vacuna correspondió a cultivo de virus de I inactivado concentrado 5X, 25% de cultivo de virus NJ inactivado concentrado 5X y 50% adyuvante de Freund incompleto, lo cual equivale a 21 microgramos de glicoproteína G I/ml de vacuna y 23.4 microgramos de glicoproteína G NJ/ml de vacuna. En la Tabla 2 se muestra la cantidad correspondiente de glicoproteína G I y NJ con la que se inocularon los cobayos del grupo A y B, de acuerdo a los volúmenes utilizados (0.4 ml y 0.2 ml de vacuna, respectivamente).

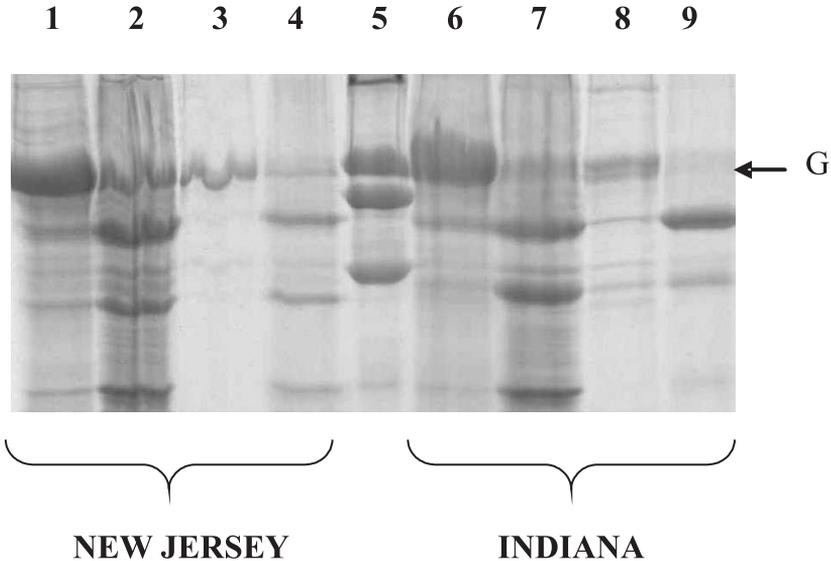


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) (G = Glicoproteína G). Los canales 1 al 4 contienen muestras de virus de EV serotipo NJ y los canales 6 al 9 de serotipo I. El patrón de peso molecular se observa en el canal 5; Canales 1y 6: muestra de cultivo viral inactivado; Canales 2 y 7: muestra de paso intermedio durante la purificación viral; Canales 3 y 8 muestra de glicoproteína G purificada; Canales 4 y 9 muestra de proteínas eliminadas durante la purificación de la glicoproteína G.

Esterilidad de la vacuna: Fue satisfactoria ya que no se evidenció crecimiento de microorganismos en los agares ni en los caldos durante los quince días de observación.

Resultados de serología a los 30 días posvacunación: En la Tabla 3 se observan los títulos de anticuerpos neutralizantes de los cobayos pertenecientes al grupo A los cuales fueron inoculados con 0.4 ml de vacuna. El promedio aritmético para I fue 4.0 log y para NJ 4.61 log y los resultados de los títulos de anticuerpos neutralizantes de los cobayos del grupo B que fueron inoculados con 0.2 ml de vacuna. Los promedios aritméticos fueron 3.66 log y 4.05 para I y NJ respectivamente.

DISCUSIÓN

Con la presente investigación se logró determinar la multiplicidad de infección en cultivos de células BHK-21, obteniéndose el mayor rendimiento de título infeccioso a las 16 horas posinfección para los dos virus NJ e I, después de este tiempo comienzan a bajar considerablemente los títulos infecciosos, sugiriendo este hecho que los virus se van degradando al agotarse el sustrato celular. El título fijador de complemento fue óptimo para los dos virus I y NJ a las 18 horas posinfección. Este título

está correlacionado con el título infeccioso y es un indicador de la buena calidad del antígeno (Camargo, 1950). Sin embargo, se observó que aunque los títulos infectantes se disminuyeron a las 18 horas posinfección, los títulos fijadores de complemento se mantuvieron, lo cual nos indica que aparentemente la cantidad de antígeno se mantiene pero si el cultivo viral continúa es probable que disminuya la calidad del inmunógeno.

Lo anterior constituye una mejora sustancial en el proceso de producción de cultivos de virus de EV a nivel industrial, ya que el laboratorio estaba utilizando mayor cantidad de semilla de virus para inocular los cultivos virales lo cual se veía reflejado en un incremento en la duración de los mismos y títulos virales más bajos en comparación con los obtenidos en este experimento, lo cual es probable que se deba al efecto de interferencia viral que se ha documentado en repetidas ocasiones para el virus de la EV (Cave, *et al*, 1985)

Estos títulos infecciosos y fijador de complemento son óptimos para la producción de la vacuna experimental contra la EV ya que en varios ensayos de vacunas desarrolladas por el ICA, partiendo de virus con títulos infecciosos similares, se obtuvieron resultados muy satisfactorios en bovinos de experimentación y en predios localizados en

Tabla 2
Diseño experimental para la evaluación de dos concentraciones diferentes de glicoproteína G de I y NJ en la formulación de vacuna contra la EV

Serotipo	Grupo A (10 cobayos) 0.4 ml de vacuna	Grupo B (10 cobayos) 0.2 ml de Vacuna
Indiana (mg glico G/dosis)	8.4	4.2
New Jersey (mg glico G/dosis)	9.4	4.7

Tabla 3

Títulos de anticuerpos neutralizantes a los 30 días posvacunación de los 20 cobayos pertenecientes a los grupos A y B. Los títulos corresponden al recíproco de la máxima dilución logarítmica en la cual el suero neutraliza 100 DITC 50/ml de virus de EV para los serotipos I y NJ.

Cobayo #	Grupo A 0.4 ml de vacuna		Grupo B 0.2 ml de vacuna	
	Indiana	New Jersey	Indiana	New Jersey
1	4.95	4.55	3.45	4.35
2	3.45	3.75	3.75	4.05
3	3.45	4.35	3.45	4.35
4	3.75	4.35	3.75	4.05
5	4.05	4.05	3.75	3.45
6	4.05	4.05	3.75	4.05
7	4.04	4.35	3.75	4.95
8	4.05	5.85	3.45	4.05
9	4.05	5.25	3.45	3.15
10	4.05	4.55	4.05	4.05
Control 1	= 0.45	= 0.45	= 0.45	= 0.45
Control 2	= 0.45	= 0.45	= 0.45	= 0.45
Control 3	= 0.45	= 0.45	= 0.45	= 0.45

distintas áreas endémicas de la enfermedad (Arbeláez *et al.*, 2003; 1989; 1988; 1982).

Los cobayos vacunados con 0.4 ml de vacuna con virus completo, bivalente e inactivada, mostraron un promedio de título neutralizante de 4.61 log contra el virus NJ y de 4.0 log contra el virus I. En general los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos en ambos grupos de cobayos se correlacionan con protección en bovinos, los cuales se protegen al desafío con 10.000 DITC50/ml (dosis infectante tejido celular 50) de virus vivo por vía intradermolingual, cuando presentan títulos seroneutralizantes = 4 log, según estudios experimentales desarrollados por el ICA (Arbeláez *et al.*, 1989, 1988).

En un estudio experimental Yilma *et al.* (1985), reportaron que se logró buena in-

munidad en ratones inoculados con 10 microgramos de glicoproteína G del virus de EV NJ. En el presente trabajo se encontró que aún inoculando cobayos con un poco menos de la mitad de la dosis (4.2 y 4.7 microgramos de glicoproteína G de I y NJ respectivamente) se obtuvo una buena inmunidad.

Teniendo en cuenta lo anterior la producción de la vacuna contra la EV con base a la cuantificación de glicoproteína G es una herramienta más precisa que el título infectante debido a que este último cuantifica partículas virales únicamente antes de la inactivación, sin tener en cuenta la posible degradación viral o pérdida de inmunogenicidad de algunas partículas virales durante el proceso de inactivación.

CONCLUSIONES

Los resultados primarios de este estudio condujeron a una mejora directa en la producción industrial de cultivos de virus de EV por parte del laboratorio nacional, obteniéndose cultivos con mayor título viral y en menor tiempo de cultivo. Adicionalmente se puede concluir que la formulación de vacuna contra estomatitis vesicular a partir de la cuantificación de la glicoproteína G puede ser una metodología de gran utilidad en la producción industrial de vacunas de buena calidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios Vecol S.A. por la financiación y el préstamo de las instalaciones para realizar este proyecto.

LITERATURA CITADA

- ABAD, J.; MORALES, L. *Estudio retrospectivo del impacto económico de la estomatitis vesicular en un hato lechero de la zona cafetera: 1980-1985*. Tesis de grado. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, 1986, 85 págs.
- AFSHAR, A.; SHAKARSHI, N. N.; DULAC, G. C. Development of a competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine, porcine and equine antibodies to vesicular stomatitis virus. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, 31, 1860-1865.
- ARBELÁEZ, G.; GUTIÉRREZ, A. Estandarización de la técnica de microneutralización para anticuerpos del virus de fiebre aftosa. *Revista ICA*, 1979; 16, 87-92.
- ARBELÁEZ, G.; CARDONA, U.; ROCHA, J. R.; RÍOS, W. Ensayo de vacunas contra la estomatitis vesicular II. Observación experimental de campo. *Revista Acovez*, 1982; 6 (20): 27-34.
- ARBELÁEZ, G.; ROCHA, J.R.; BERNAL, C. Ensayo de vacunas contra la EV. III Respuesta protectora de un inmunógeno del serotipo New Jersey. *Revista Acovez*, 1988; 12: 18-23.
- ARBELÁEZ, G.; VALBUENA, R.M.; ROCHA, J.R. Respuesta protectora de un inmunógeno contra la estomatitis vesicular serotipo indiana. *Revista ICA*, 1989; 24: 19-24.
- ARBELÁEZ, G.; PINEDA, L.A.; SÁNCHEZ, C.; QUINTERO, M. Estomatitis vesicular en Colombia. 1989-1994. *Revista Acovez*, 1995; 20 (68): 22-25.
- ARBELÁEZ, G.; ARISTIZÁBAL, J. A.; SÁNCHEZ, C.; MORALES, L. F.; BARRERA, J. C. Evaluación de una vacuna contra la estomatitis vesicular en bovinos en los municipios de Frontino y Abriaquí (Antioquia). *Revista Acovez*, 1995; 28 (2): 3-10.
- ARBOLEDA, J.; TRUJILLO, C. La estomatitis vesicular: algunos aspectos históricos, clínicos, eco-epidemiológicos virológicos, de prevención y control. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2002; 15: 3-12.
- BARTELING, S. J. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Review Science Technology*, 2002; 12: 577-588.
- BRIDGES, V. E.; MCCLUSKEY, B. J.; SALMAN, M. D.; HURD, H. S.; DICK, J. Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United States. *Journal American Veterinary Medical Association*, 1997; 211 (5): 556-560.

- CAMARGO, N.; EICHORN, E.; LEVINE, J.; TÉLLEZ, G. A complement fixation technique for foot and mouth disease and vesicular stomatitis. 87th Annual Meeting American Veterinary Medical Association. *Mexico Proceeding*, 1950; 207-221.
- CARTWRIGHT, B.; BROWN, F. Serological relationships between different strains of vesicular stomatitis virus. *Journal General Virology*, 1972; 16 (3): 391-398.
- HANSON, R. P. The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriological Reviews*, 1952; 16, 179-204.
- HOUSE, J. A.; DUBOURGET, P.; LOMBARD, M. Protective immunity in cattle vaccinated with a commercial scale, inactivated, bivalent vesicular stomatitis vaccine. *Vaccine*, 2003; 21: 1932-1937.
- ICA. Boletín epidemiológico semanal de alertas para acción inmediata. Semana (del 27 de mayo al 2 de junio de 2007). URL: www.ica.gov.co. Consulta: julio15 de 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227, 680-685.
- LASERNA, B.; JARAMILLO, M. Producción de vacunas inactivadas contra la estomatitis vesicular. Memorias VI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bogotá, 1967; 4 págs.
- LETCHWORTH, G. J.; RODRÍGUEZ, L. L.; BARRERA, J. C. Vesicular stomatitis. Review. *The Veterinary Journal*, 1999; 157: 239-260.
- MATLIN, K. S.; REGGIO, H.; HELENIUS, A.; SIMONS, K. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *Journal Molecular Biology* 1982; 156 (3): 609-631.
- OIE. Organización Internacional de Epizootias. Foot and Mouth Disease Part 2, Section 2.1, Chapter 2.1.1. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004*; URL: http://www.oie.int/eng/en_index.htm. Consulta: marzo 12 de 2007.
- ORREGO, A.; ARBELÁEZ, G.; CARDONA, M. C. Estomatitis vesicular en bovinos de zonas cafeterías. II Encuesta epidemiológica. *Revista ICA*, 1988; 23: 136-144.
- ROSE, N.; ROBERTS, A.; BUONOCORE, L. Glycoprotein exchange on vesicular stomatitis virus allow effective boosting an generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 2000; 74 (23): 10903-10910.
- YILMA, T.; BREEZE, R. G.; RISTOW, S. Immune responses of cattle and mice to the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1985; 185: 101-115.

Recibido: 06-07-07

Aprobado: 28-02-08