

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Jaime G. Cajas¹;
 Joyce A. Rojas¹;
 Jorge E. Almansa²;
 Myriam T. Wilches²;
 Camilo Sánchez³;
 Orlando Acosta⁴

ABSTRACT

Title: Comparison between the immune response to vesicular stomatitis proteins virus in vaccinated bovine and naturally or induced infected ones

The induced humoral immune response against structural proteins of Indiana and New Jersey serotypes of the vesicular stomatitis virus was compared using serum obtained from vaccinated bovine, natural and experimentally infected ones. It was used Western blot technique to observe the recognition of protein G by serum of vaccinated animals, and the response to proteins G and N by serum of infected animals. Serum of experimentally infected animals showed crossed reaction for protein N. Were carried out electrophoretic and densitometric analysis on 13 vesicular stomatitis virus subclones isolated from various endemic areas of the country. The results showed complete homology, independent from their origin according to the reported literature.

Key words: Immune response, bovine, vesicular stomatitis virus.

1. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias; 2. Programa Nacional de Investigación en Salud Animal, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA-CEISA; e-mail: jealmansa@hotmail.com; 3. Laboratorio Nacional de Enfermedades Vesiculares, ICA; 4. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Comparación de la respuesta inmunológica a las proteínas del virus de la estomatitis vesicular entre bovinos vacunados e infectados de manera natural o inducida

RESUMEN

Se comparó la respuesta inmune humoral inducida por las proteínas estructurales del virus de la estomatitis vesicular (serotipos Indiana y New Jersey), utilizando sueros de bovinos vacunados e infectados natural y experimentalmente. Para ello, se usó la técnica de inmunotransferencia (*Western blot*) a través de la cual se observó el reconocimiento exclusivo de la proteína G en sueros de animales vacunados, así como de las proteínas G y N en sueros de animales infectados. Los sueros de los animales infectados experimentalmente presentaron reacción cruzada en el caso de la proteína N. Se realizaron corridos electroforéticos y densitométricos de 13 subclones del virus de la estomatitis vesicular aislados en distintas áreas endémicas del país. Los resultados mostraron una homología completa e dependiente de su lugar de origen, lo cual es coherente con la literatura reportada.

Palabras claves: Respuesta inmune, bovino, virus de la estomatitis vesicular.

INTRODUCCIÓN

LA ESTOMATITIS VESICULAR (EV) es una enfermedad de origen viral cuyo agente etiológico pertenece a la familia Rhabdoviridae y al género *Vesiculovirus*, del cual se reconocen dos serotipos de importancia económica para la industria bovina: New Jersey (NJ) e Indiana (I). La enfermedad afecta también las especies equina, porcina, caprina, ovina, los camélidos, algunas especies salvajes y, eventualmente, al hombre (Stallknecht *et al.*, 1999 y Bridges *et al.*, 1997). El cuadro clínico se caracteriza por lesiones vesiculares en el epitelio de la mucosa oral, la lengua, las bandas coronarias de los cascos y los espacios interdigitales. En las hembras bovinas en producción, la ubre y particularmente los pezones se pueden ver severamente afectados; en los machos pueden aparecer vesículas en el prepucio. Los síntomas descritos coinciden ampliamente con los observados en episodios de fiebre aftosa, y como en ella, los casos fatales son raros, siendo la recuperación usualmente rápida y completa. En el hombre la enfermedad se desarrolla como un proceso clínico debilitante similar al producido por la influenza (Hanson, 1981 y Manson, 1978).

La presencia del virus de la estomatitis vesicular (VEV) parece estar limitada al hemisferio occidental, en especial a los

países que bordean el mar Caribe como México, Costa Rica, Colombia y Venezuela. En Colombia, la EV fue diagnosticada por primera vez en 1929 durante un brote ocurrido en el departamento del Huila (Almanza, 1946 y Laserna, 1967, citados por González y Torres, 1979). En la actualidad, a medida que el número de casos de fiebre aftosa ha descendido como resultado de las campañas de prevención, los brotes de EV han venido ganando espacio e importancia, como lo demuestra el hecho de haber sido diagnosticados 501 casos de EV-NJ y 146 de EV-I durante el año 2002 (datos no publicados, Laboratorio Nacional de Enfermedades Vesiculares del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA).

Por otra parte, el virus de la EV presenta una alta variabilidad genética debido a la tendencia de su transcriptasa a “cometer errores” durante la replicación del genoma viral, razón por la cual la progenie puede contener gran número de variantes, lo que permite una rápida adaptación. A pesar de ello, las secuencias de nucleótidos en los genomas virales se mantienen estables en áreas endémicas, mientras que tienden a variar progresivamente en sentido norte-sur en el hemisferio occidental y a diferentes altitudes (Rodríguez *et al.*, 2002).

De acuerdo con la literatura sobre el tema, la proteína G ubicada sobre la membrana viral corresponde a la sustancia inmunogénica dominante en la respuesta inmune humoral y genera anticuerpos neutralizantes contra cuatro epítopos claramente definidos; esta respuesta sería independiente de la desplegada por las células T. Por otra parte, la respuesta celular se dirige principalmente contra epítopos ubicados en la proteína N (Webster and Granoff, 1994; Letchworth *et al.*, 1999). Experimentos realizados en ratones señalan que las respuestas de linfocitos T restringidos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad-I (CMH-I) son específicas contra la proteína de nucleocápside, mientras que los linfocitos T restringidos por el CMH-II muestran especificidad por la proteína viral G (Webster and Granoff, 1994).

Dado que en Colombia se viene aplicando una vacuna homóloga, bivalente e inactivada en bovinos ubicados en áreas ganaderas endémicas (Arbeláez *et al.*, 1998; Pachón y Sánchez, 1995), en el presente trabajo se compara la respuesta inmune humoral entre los animales vacunados y aquellos infectados natural y/o experimentalmente, con miras a obtener una metodología que permita distinguir a los animales con tales características, lo cual puede tener implicaciones de importancia en estudios epidemiológicos.

Materiales y métodos

Se analizaron 13 subclones virales diferentes, aislados en distintas áreas endémicas de Colombia, mediante la técnica de inmunotransferencia, los cuales se enfrentaron con sueros de bovinos vacunados (dos mezclas o "pool" y un suero), sueros de animales con infección natural (dos sueros, uno positivo al serotipo I y otro al serotipo NJ) y sueros de animales con infección inducida (uno con serotipo I y otro, NJ) utilizando la siguiente secuencia experimental:

Obtención de muestras

Los aislamientos virales se realizaron a partir de tejidos epiteliales linguales y podales provenientes de animales con enfermedad vesicular que llegaron al Laboratorio Nacional de Enfermedades Vesiculares del ICA; previamente, a estos casos se les había practicado una prueba diagnóstica de fijación de complemento con antisueros específicos para la cual resultaron positivos al VEV (NJ o I). Se seleccionaron 13 muestras, seis de las cuales correspondieron al serotipo NJ y siete

al serotipo I (Tabla 1). En la selección de las muestras se tomó en cuenta que hubieran sido obtenidas de animales provenientes de diferentes áreas endémicas del país.

Los tejidos recolectados se procesaron según el *Manual de técnicas del laboratorio de enfermedades vesiculares* (ICA, 1997). Los tejidos se conservaron en congelación a -40°C hasta el momento de su procesamiento; luego, se colocó aproximadamente un gramo de tejido en un mortero y se realizaron tres lavados con solución salina estéril a fin de retirar la glicerina proveniente del medio de transporte. El epitelio se maceró con arena estéril, se adicionaron 7 ml de medio de extracción Earle, se centrifugó a 12.000 X g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Para la ejecución de las pruebas de infectividad se tomaron 0,2 ml del sobrenadante y se inocularon en frascos plásticos de 25 cm² en los que se habían cultivado células VERO hasta alcanzar una confluencia de 100%. Se permitió la adherencia durante una hora, se lavaron las superficies de las monocapas y luego se adicionó el medio de mantenimiento (MEM, SFB, glutamina, Tricine, Pest, bicarbonato, pH 7.0). Cuando se observó efecto citopático (desprendimiento de la monocapa), se congelaron y descongelaron los frascos, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron (10.000 X g durante 5 minutos) a fin de limpiarlos de células y detritus celulares. Estos sobrenadantes constituyeron las soluciones madre del virus, a partir de las cuales se tomaron las alícuotas para conservarlas en congelación hasta la clonación y subclonación.

Clonación y subclonación

A partir de los virus contenidos en las alícuotas (solución madre), se inocularon cajas de cultivo de seis pozos (Nunc Multidish 6[®]) con células VERO que presentaron una confluencia de 100%. Con la solución madre se realizaron diluciones sucesivas 1/10 hasta 10^{-6} , y con cada una de ellas se inoculó un pozo. Luego, se llevaron a incubar por 45 minutos al cabo de los cuales se retiró el inóculo y a cada pozo se agregaron 5 ml de una solución de agar noble (1.8%) y medio Earle 2X en una proporción 50% V/V. Las placas se incubaron durante 72 horas, tras lo cual se tomaron muestras de cada una de las Unidades Formadoras de Placa (UFP). Éstas se recogieron y depositaron individualmente en crioviales que contenían medio MEM con 20% de SFB. Para obtener subclones de cada uno de los virus ya clonados se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, a partir de soluciones de los clones virales multiplicados; así mismo, los subclones obtenidos fueron referenciados en orden numérico ascendente, de lo que se obtuvo una nomenclatura de identificación para cada virus (Tabla 1).

Multiplicación de subclones virales

Al final del proceso se obtuvieron de tres a cinco subclones por virus y se procedió a ampliar los cultivos a frascos rotantes. Cada subclon viral fue precipitado con polietilenglicol (PEG) al 7% y NaCl al 2.3%, durante una noche y a 4°C (Huang *et al.*, 1966 y McSharry and Bezinger, 1970); tras ser centrifugado y resuspendido, se purificó en gradientes continuos de sacarosa del 70 al 20% (Barrera, 1985).

Tabla 1. Lista de subclones virales seleccionados para el estudio

Número subclón	Predio	Municipio	Departamento	Especie de la muestra	Serotipo
23999-3-1	Santa Helena	Arboletes	Antioquia	Bovina	Indiana
27212-2-1	El Esfuerzo	Sahagún	Córdoba	Bovina	Indiana
26831-3-1	Catón	San Juan	Bolívar	Bovina	Indiana
27105-1-1	La India	San Andrés	Córdoba	Bovina	Indiana
27367-1-1	Naranjal	Frontino	Antioquia	Bovina	Indiana
26672-1-2	El Amparo	Manizales	Caldas	Bovina	Indiana
26614-2-2	Hato Viejo	Bolívar	Cauca	Bovina	Indiana
26679-3-2	Rancho Alegre	Chaparral	Tolima	Bovina	New Jersey
26652-4-1	Santa Ana	Pacho	Cundinamarca	Bovina	New Jersey
26598-1-2	Clavelinas	San Vicente	Santander	Bovina	New Jersey
26681-3-1	Sorrento	Pacho	Cundinamarca	Bovina	New Jersey
26800-2-1	El Molino	Cáchira	N. de Santander	Bovina	New Jersey
26603-3-2	Los Gavilanes	Pueblo Nuevo	Córdoba	Bovina	New Jersey

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La presencia del virus en las bandas obtenidas en los gradientes de sacarosa se constató por microscopía electrónica de transmisión. La electroforesis de las proteínas virales se realizó en geles de poliacrilamida de 0.7 mm de espesor y 7 cm X 8 cm de área, en una cámara para electroforesis vertical MiniPROTEAN II-BIO-RAD®, según protocolo descrito por Laemmli, 1970. El marcador de peso molecular que se utilizó contenía β-galactosidasa (116,000 Da), fosforilasa b (97,400 Da), seroalbúmina bovina (81,300 Da), fumarasa (72,000 Da) y anhidrasa carbónica (35,000 Da). La concentración de acrilamida en los geles concentrador y separador fue de 4,5 y 12,5%, respectivamente. El buffer de corrido utilizado contenía Tris base 0.123 M, glicina 0,96 M, SDS 3,46 mM. La electroforesis se realizó a 200 V 20 A, por un tiempo de 55 minutos. Algunos geles fueron coloreados con plata mediante el Kit BIO-RAD® Silver Stain (catalog number 161-0443), utilizando el protocolo modificado y optimizado para minigeles sobre los que se realizaron las lecturas densitométricas, mientras que otros minigeles fueron empleados para llevar a cabo la inmunotransferencia.

Inmunotransferencia

La transferencia de las proteínas presentes en los geles a una membrana de nitrocelulosa (0,45mm) (Burnette, 1981), se realizó utilizando la cámara de transferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell-BIO-RAD®. El gel se lavó con buffer de transferencia (Haid and Suissa, 1983) para remover las sales y detergentes del buffer de la electroforesis. Después se cortó la membrana de nitrocelulosa de acuerdo con las dimensiones del gel, se marcó para identificar la orientación del corrido electroforético y se dejó en buffer de transferencia a 4°C, durante 30 minutos. La electrotransferencia se realizó a 30 voltios durante toda la noche. Finalizada la transferencia, se confirmó el traspaso de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, tiñendo el gel con azul de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989). Para bloquear las reacciones inespecíficas, las membranas fueron tratadas con leche descremada europea (Marvel®), la cual se encontraba libre de antígenos y anticuerpos contra estomatitis vesicular, al 5% en solución amortiguadora TBS (Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5), por 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiem-

po se realizaron 5 lavados, cada uno de 5 minutos, con TTBS (Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.5).

Las tiras resultantes fueron enfrentadas contra los sueros proporcionados por el Laboratorio del ICA. Los sueros correspondían a un animal negativo procedente de la Sabana de Bogotá (zona libre del proceso infeccioso estudiado), animales de la zona del municipio de Frontino (Antioquia) vacunados con la vacuna inactivada bivalente producida comercialmente por la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios -VECOL- (Estomatitis®), animales infectados experimentalmente por vía intradermolingual con 10.000 dosis infectantes (DI) y animales infectados de forma natural. Cada uno de los sueros se diluyó en 1/50 con leche descremada al 5% en TBS y se dejó en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con solución TTBS y se les agregó a cada tira el conjugado antibovino (anticuerpo monoclonal) marcado con peroxidasa en dilución 1/200 en TTBS. Los conjugados se dejaron actuar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo se hicieron 4 lavados con TTBS de 5 minutos cada uno y el último con TBS. Posteriormente se agregó el sustrato cromógeno (4-cloro-1-naftol) y se dejó reaccionar hasta la visualización de las bandas; en este momento se detuvo la reacción con agua destilada (Quintero, 1991).

Resultados

El proceso de clonaje y subclonaje permitió el aislamiento de tres a cinco clones por virus, a partir de las unidades formadoras de placa (UFP). La línea celular seleccionada para el presente trabajo fue VERO, ya que ésta es permisiva para la propagación del virus de la estomatitis vesicular, con una tasa alta de reproducción y exigencias nutritivas mínimas. Los subclones del virus de la estomatitis vesicular, tanto New Jersey como Indiana, mostraron un marcado efecto citopático con destrucción de la monocapa entre un 90 a 100% aproximadamente 12 horas después de la inoculación.

El sistema de purificación del virus, en gradiente continuo de sacarosa, dio como resultado unas bandas definidas localizadas alrededor del 40%. En algunos casos se observaron bandas no virales, posiblemente de origen celular, ubicadas en las posiciones más bajas y ban-

das leves un poco más altas ocasionadas por la presencia de partículas interferentes. Mediante el método de Bradford se determinó la concentración de proteína obtenida tras la purificación del virus.

Los patrones electroforéticos y densitométricos de los subclones virales Indiana y New Jersey no mostraron cambios substanciales en la ubicación de las proteínas estructurales L-G-N-P-M; así mismo, los pesos moleculares de estas proteínas concuerdan con lo reportado por otros autores (Figuras 1 y 2) (Dietzhold, *et al.*, 1974; Emerson, 1976; Mohler, 1991; Pachón y Sánchez, 1995)2, por su parte, los picos del patrón densitométrico concordaron con los descritos en la literatura (Levy, *et al.*, 1994), como se observa en las figuras citadas. La mezclas (pool) de sueros de animales vacunados reconocieron exclusivamente la proteí-

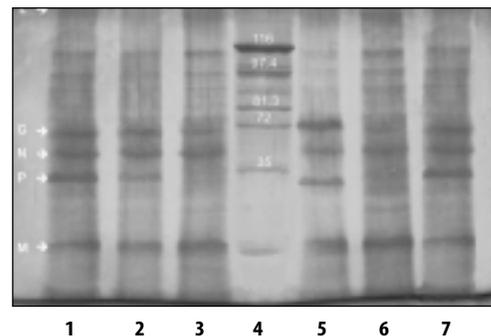


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas estructurales del virus de la estomatitis vesicular, serotipo New Jersey. Subclones: línea 1: 26679-3-2; línea 2: 26652-4-1; línea 3: 26598-1-2; línea 4: marcador; línea 5: 26681-3-1; línea 6: 26800-2-1; línea 7: 26603-3-2.

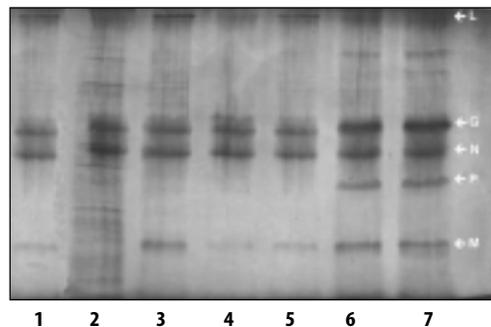


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas estructurales del virus de la estomatitis vesicular, serotipo Indiana. Subclones: línea 1: 23999-3-; línea 2: 27212-2-1; línea 3: 26831-3-1; línea 4: 27105-1-1; línea 5: 27367-1-1; línea 6: 26672-1-2; línea 7: 26614-2-2.

na G (Figura 5) y en el suero adicional se presentó doble reconocimiento (G y N); por su parte, los sueros de los animales infectados natural y experimentalmente reconocieron las proteínas G y N (Figuras 3 y 4), y cuando los sueros se montaron de manera cruzada (suero de animal infectado con VEV I contra un VEV NJ, y viceversa), sólo se presentó reconocimiento de la proteína N.

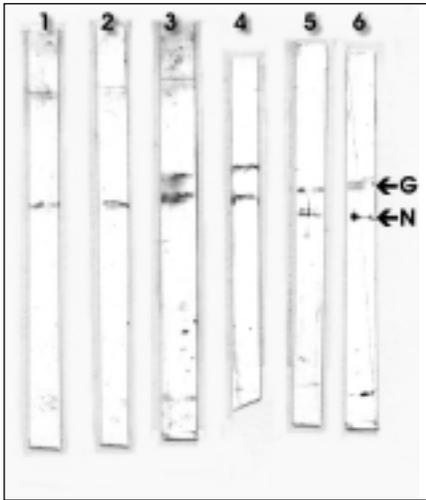


Figura 3. Western blot de virus de estomatitis vesicular, serotipo I frente a sueros de bovinos infectados naturalmente (1, 2 con VEV NJ y 3 con VEV I) y experimentalmente (4, 5 y 6 con VEV I). 1. Subclon 27367-1-1; 2. Subclon 23999-3-1; 3. Subclon 26831-3-1; 4. Subclon 27105-1-1; 5. Subclon 26614-2-2; 6. Subclon 26672-1-2.

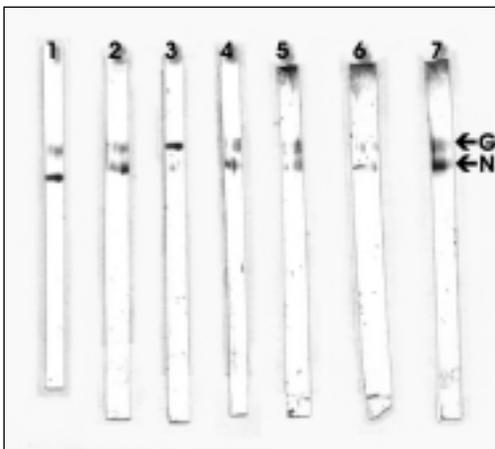


Figura 4. Western blot de virus de estomatitis vesicular serotipo NJ frente a sueros de animales infectados naturalmente (1, 2, 3 y 4) y experimentalmente (5, 6 y 7). 1. Subclon 26679-3-1; 2. Subclon 26652-4-1; 3. Subclon 26598-1-2; 4. Subclon 26800-2-1; 5. Subclon 26681-3-1; 6. Subclon 26603-3-2; 7. Subclon 26800-2-1.

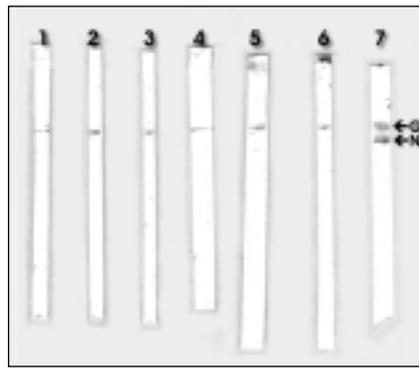


Figura 5. Western blot de virus de estomatitis vesicular serotipo Indiana (1, 2, 3 y 4) contra suero de animal vacunado (*pool*) y serotipo NJ (5, 6 y 7) frente a sueros (*pool*) de animales vacunados. El 7 se corrió con el tercer suero de animal vacunado. 1. Subclon 26614-2-2; 2. Subclon 27367-1-1; 3. Subclon 26831-3-1; 4. Subclon 23999-3-1; 5. Subclon 26679-3-1; 6. Subclon 26681-3-1; 7. Subclon 26800-2-1.

Discusión

Los pesos moleculares de las proteínas del VEV, evidenciados durante las electroforesis y confirmados mediante patrón densitométrico, concuerdan con lo reportado por otros autores (Dietzchold *et al.*, 1974; Emerson, 1976; Mohler, 1991; Pachón y Sánchez, 1995; Levy, *et al.*, 1994).

De otra parte, los resultados obtenidos concuerdan con la literatura (Fields *et al.*, 1996) en cuanto los anticuerpos generados durante la respuesta inmune humoral estuvieron dirigidos hacia los dos antígenos mayores del VEV, como son las proteínas N y G. En esta última se han definido cuatro epítopes neutralizantes en los serotipos NJ e I. De igual manera, se demuestra que la reactividad inmunológica de la proteína se conserva y presenta un patrón de reconocimiento similar en todos los subclones, a pesar de provenir éstos de diferentes regiones geográficas enzoóticas del país. Este hecho, sin embargo, no descarta una posible variación antigénica entre los distintos aislamientos virales. El reconocimiento de la proteína G, tanto por los sueros de animales vacunados como en aquellos de animales infectados de forma natural e inducida, confirma lo reportado en la literatura

Así mismo, el hecho de que la proteína N sólo sea reconocida por los sueros de los animales infectados, conduce a pensar que la respuesta de anticuerpos a esta proteína depende de que se produzca el ciclo de replicación con procesamiento y presentación de antígenos, pos-

tulado que debe ser sometido a confirmación mediante nuevas pruebas científicas. Vale recordar que las células T citotóxicas reconocen tan sólo células que presenten antígenos relacionados con las proteínas G y N. A pesar de que, por lo general, en los virus de la familia Rhabdoviridae los anticuerpos dirigidos contra la proteína G son neutralizantes, ha sido reconocido el papel protector de los anticuerpos contra la proteína N, aunque su significado en animales vacunados es desconocido (Webster and Granoff, 1994). Es interesante que exista inmunidad cruzada para la proteína N entre los dos serotipos del virus de la estomatitis, ya que si en realidad existe protección por parte de esa respuesta, la proteína N deberá ser mejor estudiada en la perspectiva de la preparación de biológicos vacunales.

El hallazgo realizado en el presente trabajo, genera una metodología que discrimina los animales vacunados de los infectados natural o experimentalmente; además, establece la necesidad de estudiar más profundamente la respuesta humoral contra la proteína N viral y su significado biológico.

El reconocimiento de la proteína G por parte de los sueros de animales vacunados se debe a la utilización de vacunas preparadas con virus inactivados y adyuvadas, las cuales generan una respuesta inmune débil dirigida principalmente hacia la proteína externa del virus; también, las bandas obtenidas a partir de sueros de animales vacunados fueron siempre más tenues

La diferenciación clara entre los animales infectados y los vacunados con biológicos inactivados permite convertir la técnica de inmunotransferencia en un método eficiente para realizar estudios epidemiológicos en áreas endémicas vacunadas, a fin de confirmar la exposición previa al VEV, ya que no se ha hallado explicación a la gran variabilidad en los títulos de anticuerpos neutralizantes en animales de dichas áreas. El suero adicional de un animal vacunado que presentó reconocimiento de las proteínas N y G correspondería a un animal que ha sido infectado y vacunado, como cabe esperar en muchos de los bovinos ubicados en zonas enzoóticas.

Durante 1995 en Colombia se vacunaron 2.000 bovinos de 23 predios en las áreas endémicas de Frontino y Abriaquí (Antioquia), con revacunación cada 180 días. Las evaluaciones epidemiológicas y serológicas de títulos de anticuerpos

neutralizantes durante un período de 450 días, mostraron fluctuaciones en esos títulos (Arbeláez *et al.*, 1998). No se conoce si estas fluctuaciones corresponden a la infección de los animales por virus de campo o a que transcurrido un tiempo de la vacunación, se presente liberación de antígenos a partir de las células dendríticas que induzcan la elevación de dichos títulos. Debido a estos interrogantes, se propone, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, realizar un estudio epidemiológico en áreas endémicas de Colombia que adelanten campaña de vacunación (Yilma *et al.*, 1985 y Grigera *et al.*, 1996).

BIBLIOGRAFÍA

Arbeláez G.; Aristizábal, J. A.; Sánchez, C.; Morales, L. F.; Quintero, M. y Barrera, J. 1998. Evaluación de una vacuna contra la estomatitis vesicular en bovinos en los municipios de Frontino y Abriaquí (Antioquia, Colombia).

Barrera, José del Carmen. 1985. Changes in vesicular stomatitis virus New Jersey during propagation in cell culture. Thesis Magister Scientiae. University of Wisconsin. Madison, U.S.A.

Bridges, V. E.; McCluskey, B. J.; Salman, M. D.; Scott Hurd H. and Dick, J. 1997. Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United States. JAVMA 211(5):556-560.

Burnette, W. N. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfat –polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinate protein A. Anal. Biochem. 12:195-203.

Dietzhold, B.; Schneider, L. and Cox, J. 1974. Serological characterization of the three major proteins of vesicular stomatitis virus. Journal of Virology 14:1-7.

Emerson, S. 1976. Vesicular stomatitis virus: structure and function of virion components. Current topics in microbiology and immunology 73:1-34.

Fields, B. N.; Knipe, D. M. and Howley, P. M. 1996. Rhabdoviridae: The viruses and their replication, p. 561-575. *En: Fundamental Virology*. 3 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.

González G. y Torres, M. 1979. Arbovirus en Colombia. Revisión de literatura. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2(3):165-179.

Grigera, P. R.; García-Briones, M.; Peñero, O.; La Torre, J. and Wagner R. R. 1996. Immunogenicity of an aphthovirus chimera of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus. Journal of Virology 70(12):8492-8501.

Haid, A. and Suissa, M. 1983. Immunochemical identification of membrane proteins after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Methods Enzymology 96:192-205.

Hanson, R. P. 1981. Vesicular stomatitis in horses, cattle and swine, New Jersey, Indiana viruses. p. 517-539. *En: Viruses diseases of food animals*. Vol. 2, New York Academic Press.

Huang, A.; Greenawalt, J. and Wagner, R. 1966. Defective T particles of VSV. I. Preparation, morphology and some biology properties. Virology 30:161-172.

Laemmli, W. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Levy, J. A.; Franenkel-Conrat, H. and Owens, R. A. 1994. Virology. 3 ed. New Jersey: Prentice Hall. p. 77-84.

Letchworth, G. J., Rodríguez, L. L. y Barrera J. del C. 1999. Vesicular stomatitis. Review. The Veterinary Journal 157:239-260.

Manson, J. 1978. La epidemiología de la estomatitis vesicular. Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 1333:129-30.

McSharry, J. and Bezinger, R. 1970. Concentration and purification of vesicular stomatitis by polyethyleneglycol precipitation. Virology 40:745-746.

Mohler, J. 1991. Vesicular stomatitis of horses and cattle. United States Department of Agriculture Bulletin 622:11.

Pachón, Sandra P. y Sánchez, Claudia L. 1995. Caracterización de subpoblaciones virales del virus de estomatitis vesicular serotipo Indiana circulantes en Colombia. Bogotá, pp.95. Trabajo de grado para optar al título de bacterióloga. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la Salud, Colombia.

Quintero, Myriam de B. 1991. Caracterización de las partículas interferentes del virus de la estomatitis vesicular Indiana y estudio de su respuesta antigénica. Bogotá. 119 pp. Trabajo de grado (*Magister Scientiae*). Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

Rodríguez, L. L.; Bunch, T. A.; Fraire, M. and Llewellyn, Z. N. 2002. Re-emergence of vesicular stomatitis in the western United States is associated with distinct viral genetic lineages. Virology 271(1):171-81.

Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (Eds.) 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Vol 3. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Stallknecht, D. E.; Howerth, E. W.; Reeves, C. L. and Seal B. S. 1999. Potential for contact and mechanical vector transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. AJVR 60(1):43-48.

Webster, R. and Granoff A. 1994. *Encyclopaedia of Virology*. Vol. 3, San Diego, Academic press. pp. 1547-1555.

Yilma, T.; Breeze, R. G.; Ristow, S.; Gorham, J. R. and Leibi, S.R. 1985. Immune responses of cattle and mice to the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus. Advances in Experimental Medicine and Biology. 185:101-115.