

Ecoepidemiología de la Estomatitis Vesicular en un municipio cafetero de Antioquia

John J Arboleda¹, MV MS.; Guillermo A. Restrepo¹, MV; Marta I Wolff² Biol. PhD; Jaime H Uribe¹ Zoot; Horwald A Bedoya¹, Est. MV; Victor H Quiroz¹, Est MV; Sandra Pérez², Biol. ; Luis F. Morales³, MV; Iván D Piedrahita³, MV. MS; Fabio N Zuluaga⁴, MV. MSc.; Jorge Ossa⁴, MV. Ph.D.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, ² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, ⁴Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, A.A 1226 Medellín; ³Programa ICA-USDA, Antioquia

(Recibido: 17 julio, 2000; aceptado: 13 marzo, 2001)

Resumen

Se realizó un seguimiento bimensual durante un año, en dos fincas lecheras del Municipio de Fredonia, Antioquia, en mamíferos silvestres, vectores incriminados y en hatos centinelas, con el objetivo de determinar por seroneutralización los porcentajes de animales infectados con el virus de la Estomatitis Vesicular, realizar intentos de aislamiento viral en cada una de estas poblaciones, y detectar fragmentos del genoma viral por RT-PCR y PCR anidado. Se encontró que el porcentaje de infección fue del 57.14% para el serotipo Indiana (IN) y del 73.01% para el New Jersey (NJ), igualmente se determinó que el 37.5% de los animales silvestres capturados mostraron bajos títulos de anticuerpos, 1:8 principalmente y solamente contra el serotipo IN, lo cual parece sugerir que el ciclo de infección en la fauna silvestre no está relacionada con el ciclo en los animales domésticos. De otro lado todas las muestras de sangre de reservorios y macerados de insectos procesadas por las técnicas moleculares mencionadas mostraron resultados negativos. Se discuten los resultados y se proponen nuevos estudios.

Palabras clave: *Didelphis marsupialis, Hatos Centinelas, Reservorios, Simulium spp., Vectores.*

Introducción

La Estomatitis Vesicular (EV) es una enfermedad producida por virus de la Familia Rhabdoviridae, Género Vesiculovirus, de los cuales existen dos serotipos importantes en nuestro medio, Indiana (IN) y New Jersey (NJ). Los virus de la EV son mononegavirus, osea que poseen una cadena sencilla de ARN de sentido negativo, poseen glicoproteínas en su superficie, las cuales inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y hemoaglutinantes, los cuales reaccionan específicamente con cada serotipo y se utilizan para su diferenciación serológica. En general estos virus son sensibles a pH bajo y a altas temperaturas (8,19).

La enfermedad afecta principalmente a cerdos, caballos y bovinos, produciendo en ellos, vesículas y úl-

ceras en la boca, rodete coronario y pezones, especialmente en vacas en producción (3,4).

Existen muchos interrogantes con respecto al comportamiento epidemiológico de la EV, pero igualmente se dispone de varias hipótesis para explicar los ciclos de transmisión de la infección, se dice, por ejemplo, que en regiones endémicas, un artrópodo vector transmite el virus desde un reservorio no identificado (se incluyen plantas, roedores y marsupiales silvestres e incluso animales domésticos como aves y cabras) a animales susceptibles. En especies del Género *Lutzomyia*, se han hecho estudios con ambos serotipos del virus logrando en ellas, el aislamiento y la replicación viral, la transmisión transovárica y la transmisión experimental a roedores (9, 15,16,19), pero la importancia de estos y otros insectos en la epidemiología de la enfermedad y su aso-

ciación con regiones endémicas aún sigue sin aclararse totalmente. También se ha demostrado que es posible que haya transmisión de infección entre vectores, mosca negra, por coalimentación sobre animales no virémicos (10). La infección puede transmitirse igualmente en forma horizontal entre los animales susceptibles pero aún no se conoce la proporción de animales diseminadores del virus (16,19).

Los virus de la EV han sido aislados exclusivamente de mamíferos e insectos del Nuevo Mundo, desde Canadá hasta Argentina, al parecer cada una de las poblaciones virales poseen diferencias genéticas particulares establecidas por su distribución geográfica (11). Esto indica, hasta el momento, que en el continente Americano es donde se conjugan las condiciones ecológicas, climatológicas y epidemiológicas que determinan la presencia de la enfermedad. En Colombia se han logrado establecer ciertas condiciones meteorológicas como las épocas de transición de estación seca a lluviosa y viceversa y el ciclo de vida de los vectores involucrados, que influyen en la presentación de la enfermedad (4, 7).

La enfermedad, en Colombia, se presenta desde las tierras cálidas, con temperaturas promedio anual de 28°C, hasta las zonas frías con temperaturas de 8°C y alturas de 2.700msnm, sugiriendo igualmente, la participación de diferentes especies de vectores y reservorios en el mantenimiento de la infección en las zonas endémicas (3,4,5). De otro lado se han hecho estudios sobre impacto económico de la enfermedad en hatos lecheros, encontrando que la EV resulta aún más costosa que la fiebre aftosa (12).

En estudios llevados a cabo en Costa Rica con el propósito de establecer los efectos de la edad, raza, residencia de los animales en áreas con diferentes regímenes de lluvias, temperatura, potencial de evapotranspiración relativa y la altura sobre el nivel del mar, sobre la presentación de la enfermedad, encontraron que los animales que residen en áreas ubicadas entre los 500 y 1.500m tuvieron un mayor riesgo de seropositividad al virus de la EV serotipo NJ (VEV NJ), comparado con los animales residentes en zonas más bajas; igualmente los animales que residían en áreas ubicadas entre los 0 y 500m con menos de 2000mm de lluvia anual, el bosque seco tropical, tuvieron un mayor riesgo de seropositividad a VEV NJ comparados con los que habitaban en otras zonas (6,17)

Según los autores, estos resultados sugieren que existen por lo menos dos ciclos de transmisión para VEV NJ, uno localizado en las zonas más altas y el otro localizado en zonas de menor elevación y pocas lluvias. Las regiones así encontradas podrían mantener diferentes especies de artrópodos vectores y/o reservorios del virus. También encontraron que la prevalencia de anticuerpos aumentaba con la edad, sugiriendo esto una relación entre el tiempo de residencia en un área endémica y la probabilidad de poseer anticuerpos contra VEV NJ. En este estudio no se lograron establecer asociaciones entre la presencia de anticuerpos contra el VEV IN y los factores estudiados, lo cual, según los autores es un indicativo de la existencia de ciclos de transmisión diferentes para cada serotipo (6,17).

En Colombia, con la publicación de los estudios ecológicos de los virus de la EV en Antioquia, que apareció en el año de 1979 en el Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (20), se iniciaron los trabajos tendientes a demostrar las asociaciones entre los diferentes pisos térmicos de la geografía colombiana, las diferentes especies de reservorios y vectores presentes y la presencia de la enfermedad. Al final del mismo encontraron que la infección estaba presente en todos los pisos térmicos escogidos, que durante las épocas de lluvias, la prevalencia de anticuerpos aumentaba marcadamente entre los vertebrados silvestres, que incluso la presencia de anticuerpos contra el agente causal se detectaba en humanos residentes en estas zonas, que los bovinos del Valle de Aburrá tuvieron una prevalencia de anticuerpos más alta que la de los de otras áreas del estudio, al igual que los porcinos criados en el altiplano; también demostraron claramente que existían varias especies de animales reservorios infectados, variando esas especies con las zonas de estudio en donde se realizaban las capturas (20).

El presente estudio describe una primera aproximación a la caracterización de la historia natural del virus de la Estomatitis Vesicular en el Municipio de Fredonia, Antioquia, zona endémica para la presentación de esta enfermedad.

Materiales y Métodos

Zona de Estudio: El estudio se llevó a cabo en el Municipio de Fredonia, localizado al Suroeste del Departamento de Antioquia, considerada zona cafetera,

y ubicado a 1700msnm, una latitud N 5°55.622' y longitud W 75°40.328'.

El Municipio tiene una extensión de 247Km², con alturas desde los 600 hasta 2.500msnm, la precipitación pluvial anual promedio es de 2.500mm, la temperatura promedio es de 20°C y la humedad relativa del 63-80%, la región presenta dos épocas secas, una a finales del año, noviembre diciembre, y la otra entre los meses de junio y julio. La población bovina asciende a 22.640, de los cuales el 80% son de tipo carne, el 16% de doble propósito y solo un 4% de leche (2).

Se escogieron dos fincas de la zona, Aguas Lindas y La Solariega, ubicadas a 1.110msnm, N 5°54.170', W 75°43.190', y 1770msnm, N 5°55.644', W 75°40.891', respectivamente, ambas dedicadas a la explotación lechera con ganado de cruces comerciales, con predominio de la raza Holstein y Normando (UMATA, Fredonia).

Hatos Centinela: En cada finca del estudio se escogieron aproximadamente 30 animales para realizar la toma de muestras de sangre y el seguimiento bimensual para la medición de los niveles de anticuerpos durante el año de 1999. Se procuró, en la medida de las posibilidades, realizar el muestreo en los mismos animales durante todo el tiempo de estudio, con el inconveniente que las fincas están dedicadas a la venta permanente de crías para programas de doble propósito en zonas cálidas del Departamento. Cabe destacar que en ninguna de las dos fincas del estudio se habían utilizado vacunas contra la EV, ni se utilizaron durante el tiempo de la realización del estudio.

Para la medición de los niveles de anticuerpos se utilizó la técnica de Microseroneutralización en placas, usando como antígeno, cepas de campo de cada serotipo, mantenidas en la colección de cepas del Plum Island Animal Disease Center, PIADC, NY. Igualmente se utilizó la línea celular BHK-21, para los ensayos de efecto citopático.

Captura de Vectores: Se realizaron capturas cada dos meses de los insectos incriminados como vectores, empleando las trampas CDC, Shannon y la captura manual, en establos y potreros sobre cebos humano y animal, además de captura manual de estados inmaduros de *Simulium*, en las corrientes de agua existentes en cada finca o en zonas aledañas. Los ejem-

plares capturados fueron identificados en el laboratorio de Entomología del Departamento de Biología de la U de A, utilizando para ellos claves taxonómicas y dicotómicas (18)

Los vectores capturados, luego de identificados eran guardados en viales de congelación en Nitrógeno Líquido, aproximadamente en grupos de 20 individuos/vial hasta su procesamiento. Además se hicieron placas de referencia con cada especie identificada.

Captura de vertebrados silvestres: Cada dos meses se hicieron capturas de vertebrados silvestres, utilizando trampas tipo "National", cebadas con plátano y mantequilla de maní o con una mezcla de avena, mantequilla de maní y esencia de vainilla. Las trampas fueron colocadas en los bosques de galería que protegen las corrientes de agua. A cada animal capturado se le tomó una muestra de sangre entera la cual se dividió para extracción de suero y el resto fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido para realizar intentos de aislamiento viral sobre cultivos celulares y detección de infección por RT-PCR. Cada animal era identificado, con muesca en la oreja y liberado posteriormente en el mismo sitio de captura.

Aislamiento Viral: Con las muestras de sangre entera de los animales silvestres capturados además de los vectores, se realizaron intentos de aislamiento sobre monocapa formada por células BHK-21 y de línea celular de *Lutzomyia longipalpis*, LL-5, para al cabo de 72 horas de incubación observar en ellas el efecto citopático característico. Brevemente: las muestras de sangre de reservorios fueron descongeladas, diluidas 1:5 y sembradas directamente sobre células LL-5 por una hora, al cabo de la cual se aspiró el inóculo, se agregaron 100ul de medio para LL-5 y se mantenían en incubación sobre la monocapa de éstas a 28°C durante 48h, con el fin de aumentar las posibilidades y sensibilidad de aislamiento (13), al término de este tiempo, se hacía un pasaje a células BHK-21, y se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% CO₂, para buscar el efecto citopático característico e indicador de actividad viral. Con las muestras de vectores, se procedió así: las muestras eran descongeladas y los individuos macerados en el mismo vial donde habían sido congelados, con 500ul de medio de cultivo para LL-5, se centrifugaban a 14.000rpm durante 3', el sobrenadante era dividido en dos partes, una para sembrar directamente sobre LL-5, en las mismas condiciones que las muestras de los reservorios, y los res-

tantes 250ul del mismo sobrenadante o de sangre entera del reservorio, eran dispensados en 750ul de Trizol (Life Technologies, Grand Island NY) para posteriormente hacer la extracción del ARN, y realizar el RT-PCR, tratando de identificar fragmentos del genoma de los serotipos virales IN y NJ.

Microseroneutralización: Los sueros de los animales de los hatos centinela y de los reservorios, fueron probados para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra los virus de la EV, serotipos IN y NJ. Para el efecto se hicieron diluciones dobles, iniciando con 1:80 para los sueros de los animales domésticos y de 1:8 para los silvestres, usando como antígenos las cepas VSV IN R4, y el VSV NJ95366 CO, ambas cepas disponibles en el PIADC. Se utilizaron 150DICC₅₀ de cada cepa, enfrentados por separado, a cada dilución sérica, fueron incubados por 1 hora a 37°C, 5%CO₂, y finalmente se dispensaron 100ul/pozo, de la mezcla suero-virus, por duplicado, sobre platos de 96 pozos, con monocapa formada de células BHK-21, se mantuvieron los platos en las mismas condiciones de incubación descritas durante 72h, al cabo de las cuales se establece el título de anticuerpos presentes en el suero, que corresponde a la dilución más alta del suero que protege las células del efecto viral.

RT-PCR: Con las muestras de ARN de las muestras de sangre de los reservorios y vectores capturados, se procedió a realizar un RT-PCR y PCR anidado, descrito por Rodriguez y col. (14), los iniciadores utilizados para cada prueba corresponden al gen N de los virus de la EV. Se utilizó un rTth RNA PCR kit (GeneAmp EZ rTth RNA PCR Kit, perkin-Elmer, Branchburg, NJ), usando un termociclador 9600 Perkin- Elmer.

Para el RT-PCR se utilizaron:

VEV IN:
N24F:ATCATTAAGGCTCAGGAAGA
N762R:GTGTCCAAATGTTTGCCAATG

Fragmento esperado de 738 pb.

VEV NJ:
N274F:CTGGGTTAGCTTTGGAAGAA
N913:CCAGAAGTGAAAAGCTGGAT

Fragmento esperado de 639pb

Estos mismos fragmentos sirvieron de molde para realizar el PCR anidado, con los siguientes cebadores:

VEV IN:
N259F:TCATACATGTCAACAGCTACT
N373R:TATCCGATTGTATCCCCTG

Fragmento esperado de 114pb

VEV NJ:
N401F:GATGATAAATGGCTTCCCAT
N532R:ACTCTCAAATCTGGTTGACG

Fragmento esperado de 131pb

Código utilizado, N: gen del virus, el número, representa la posición del nucleótido inicial, F (Forward) y R (Reverse) significa la dirección del cebador.

El programa para cada prueba fue:

RT-PCR:
50°C x 30min
95°C x 2min
95°C x 30 seg + 50°C x 1:30min 35 ciclos
60°C x 5min
4°C hasta corrida en gel de 2% agarosa, 40V por 1h.

PCR anidado:
95°C x 2min
95°C x 30 seg + 50°C x 1:30min 35 ciclos
60°C x 5min
4°C hasta corrida en gel de 2% agarosa, 40V por 1h.

Resultados

Hatos centinela: La prevalencia general en las dos fincas fue del 76.19%, 46 animales positivos de 63 probados, del cual el 57.14% correspondieron a IN y el 73.01% a NJ. El 52.38% de los animales de fincas tuvieron anticuerpos contra ambos serotipos.

Al relacionar los resultados por fincas, en la Solariega encontramos que 19 de los 30 animales muestreados, que representan el 63.3% del total del hato en esta finca, tuvieron anticuerpos contra alguno de los 2 serotipos, el 50% fue contra IN y el 63.3% fue contra NJ, y al 46.6% de los animales se les detectaron anticuerpos contra ambos serotipos. En la finca Aguas Lindas, la prevalencia general fue del 87.8%, 29/33, con el 63.6% de los animales de la fin-

ca con anticuerpos contra el serotipo IN y el 81.8% contra el serotipo NJ, el 57.5% de los animales evidenciaron anticuerpos contra ambos serotipos. En la Finca Aguas Lindas se procesaron las muestras de suero de 33 animales con edades y estados productivos diferentes, con predominio amplio de vacas en producción. La tabla No. 1 resume los porcentajes de bovinos en cada finca del estudio con presencia de anticuerpos contra cada serotipo, contra al menos uno de ellos o contra ambos.

Vectores: Al final del estudio se lograron procesar 261 individuos, todos ellos pertenecientes al Género *Simulium*, con gran predominio de la especie *S. metallicum*, seguida por *S. mexicanum* y *S. ochraceum*, no se lograron capturas de ninguna otra especie de los vectores incriminados, tales como *Lutzomyia* spp. o *Culicoides*, a pesar de haber hecho repetidos intentos de captura.

Reservorios Silvestres: solo se procesaron 24 muestras de suero, aunque se capturaron 38 individuos, pues en algunos de ellos fue imposible obtener muestra de sangre suficiente sin correr el riesgo de que el animal muriese en el proceso, la prevalencia general fue del 37.5%, destacándose en ellos al *Didelphis marsupialis* por ser la especie más frecuentemente capturada, 17 de 38 capturas, que representa el 44.7%, del total de capturas y la de mayor número de positivos, 4/9, 44.4%. (ver tabla No. 2). Todos los animales positivos lo fueron en bajos títulos, 1:8 principalmente y ninguno de ellos presentó anticuerpos contra el serotipo NJ, solo contra el IN (ver figura No. 1).

Aislamiento Viral: Todas las muestras de insectos procesadas y las muestras de sangre de los animales silvestres, resultaron negativas para aislamiento sobre las líneas celulares utilizadas.

RT-PCR y PCR anidado: se procesaron 38 muestras de igual número de individuos, todas las muestras

resultaron negativas por ambas pruebas, cabe resaltar la gran sensibilidad de las pruebas utilizadas, pues se estaban detectando 12.5 viriones cuando se combinaban las dos técnicas. Además en cada prueba se incluyeron controles negativos y positivos y controles de extracción de ARN.

Discusión

Los resultados de nuestro trabajo, sirven como punto de partida para nuevos estudios, que procuren identificar los actores que intervienen en el ciclo de transmisión de esta importante enfermedad. No es posible, por el momento, elaborar una aproximación a la historia natural de la infección por los virus de la Estomatitis Vesicular, pero si tenemos las bases para planear y ejecutar los nuevos estudios y como deben ser consideradas las nuevas propuestas. Tenemos el equipo de trabajo y las herramientas para proponer futuros proyectos, además el estudio sirvió para poner a tono la capacidad de trabajo en conjunto de las Instituciones participantes, logrando incluso el apoyo del sector político del Municipio en donde se llevó a cabo el estudio, lo cual representa una muy promisorio forma de trabajo en problemas de interés común.

Por los resultados obtenidos, parece que el ciclo doméstico de la infección no está relacionado con el silvestre, ya que los animales silvestres que tenían anticuerpos contra el virus, mostraron un bajo título y únicamente contra el serotipo Indiana, mientras que los animales domésticos de ambas fincas tuvieron una mayor proporción de animales con anticuerpos contra el serotipo New Jersey; lo que necesario entonces plantear estudios tendientes a caracterizar ambos ciclos por separado.

De otro lado consideramos que el *Didelphis marsupialis*, es un buen candidato para iniciar estudios tendientes a determinar su papel como reservorio

Tabla 1. Porcentaje de bovinos con Anticuerpos* contra VEV en hatos centinelas de Fredonia, Antioquia. 1999-2000.

Finca	n	VEV-NJ	VEV-IN	VEV NJ-IN	NJ o IN
Aguas Lindas	33	81.8	63.6	57.5	87.8
La Solariega	30	63.3	50	46.6	63.3

*Técnica utilizada: Microseroneutralización

Tabla 2. Especies de mamíferos silvestres capturados, Fincas La Solariega y Aguas Lindas, Fredonia, Antioquia. 1999-2.000

Especie	Número Capturas	% Positivos
<i>Didelphis marsupialis</i>	17	44.7
<i>Oryzomys spp.</i>	10	26.3
<i>Oligoryzomys spp.</i>	6	15.7
<i>Heteromys spp.</i>	2	5.2
<i>Akodon spp.</i>	1	2.6
<i>Phylander opossum</i>	1	2.6
<i>Ratus ratus</i>	1	2.6
Total	38	99.7

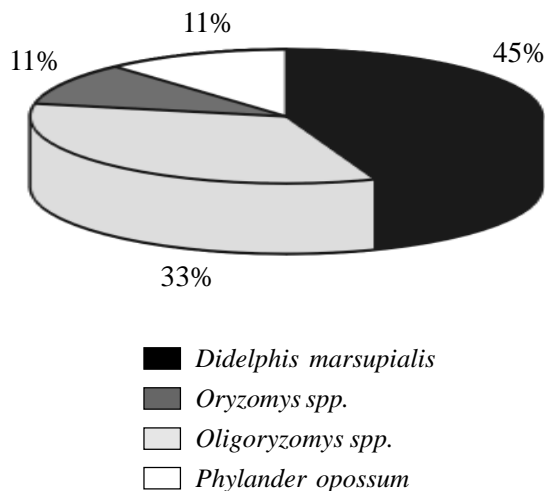


Figura 1. Prevalencia de Infección por VEV-IN en mamíferos silvestres en Fredonia, Antioquia. 1999-2000.

de la infección viral, pues de acuerdo con los resultados de otros investigadores, Zuluaga y Yuill, 1979, por ejemplo, presenta altos porcentajes de prevalencia de infección, además de que su comportamiento le permite interactuar con diferentes poblaciones en el interior de los bosques y servir de puente para el hombre y sus animales en el medio ambiente peridomiciliar.

En cuanto a las técnicas moleculares para la detección de la infección en las muestras de insectos y la sangre de los reservorios capturados, destacamos ésta como la primera ocasión en que se experimenta

esta técnica con virus EV en nuestro país. Se utilizaron el RT-PCR y el PCR anidado, el tipo de muestras analizadas y con la alta sensibilidad anotada, lo cual nos hace confiar en los resultados obtenidos, ya que cada prueba tuvo los controles adecuados. Será supremamente importante para estudios ulteriores seguir utilizando estas herramientas, dada su alta sensibilidad, para tratar de detectar material genético de cualquiera de los serotipos de los virus, en este tipo de muestras.

Con los resultados en los hatos centinelas, no se pueden sacar conclusiones en cuanto a las épocas de mayor actividad viral en las zonas de estudio, creemos que es necesario continuar este tipo de seguimiento, con una mayor duración, mínimo dos años, y utilizando otras técnicas de medición de anticuerpos, específicamente ELISAs (1), y determinar incluso los niveles de IgM, los cuales podrían ser reveladores de la situación inmune de los hatos, y de esta manera poder determinar, en zonas endémicas, las épocas del año de mayor transmisión de la infección. No se evidencia por los resultados, una época del año que pudiese ser establecida como de mayor transmisión del agente, o una época particular del año en la cual los animales del hato centinela produjeran o aumentaran sus títulos de anticuerpos contra el agente (datos no mostrados). Se hace necesario también, el seguimiento continuo de los mismos animales durante el estudio, en nuestro caso no fue posible debido a las actividades propias de las fincas, pero consideramos esta condición como fundamental para el logro de los objetivos futuros propuestos.

Igualmente, consideramos que es necesario realizar estudios de este tipo en áreas endémicas situadas en diferentes zonas de vida, a diferentes altitudes, en donde, de acuerdo a los estudios de Atwill et al, 1993 y Vanleeuwen et al, 1995, podrían existir diferentes ciclos de transmisión para los virus de la EV. Determinar las condiciones ecológicas, los posibles animales silvestres incriminados en el mantenimiento del virus en la naturaleza y los posibles insectos vectores del mismo entre ellos y los animales domésticos, es una necesidad apremiante. Consideramos que de esta manera se podrán establecer las acciones que nos permitirán controlar la aparición de la enfermedad, y disminuir las pérdidas económicas que ocasiona.

Summary

Eco-epidemiological studies of Vesicular Stomatitis in a municipality of Antioquia.

The prevalence of Vesicular Stomatitis Virus, VSV, in sentinels herds, wild reservoirs and vectors in two dairy farms in the Fredonia town, (Antioquia, Colombia), was determined. Blood serum samples from cows and wild reservoirs were tested by neutralization test, viral isolation from vectors and reservoirs; vectors macerated and blood from wild reservoirs were tested by RT-PCR and Nested-PCR to identify viral genome fragments. The percentage of domestic animals in the farms, with antibodies against VSV IN was 57.14% whereas 73.01% of the animals had antibodies against VSV NJ. On the other hand, in wild animals we found that 37.5% of them had low titer of antibodies, 1:8 principally, against VSV IN only, for this reason is suggested that domestic and wild cycle of the VSV don't have any relationship. All blood samples from reservoirs and vectors tested by RT-PCR and Nested PCR, were negative for the both serotypes. In this paper we discuss the results and we suggest the realization of additional studies regarding this aspects.

Key words: *Didelphis marsupialis, Reservoirs, Sentinels Herds, Simulium spp., Vectors.*

Agradecimientos. Los autores desean expresar sus sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones: a la Sra. Falconery Agudelo y al MV. Jairo León Alvarez, de la UMATA de Fredonia, por su colaboración y apoyo logístico para la realización del estudio; Al consejo Municipal de Fredonia y especialmente a la secretaria de Salud y Educación por el apoyo económico al proyecto; al Sr. James Celada por su valiosa colaboración, al PIADC, y al Dr. Luis Rodríguez por su gran colaboración y enseñanzas. Al USDA en la embajada de los Estados Unidos en Bogotá. Finalmente, a los encargados, propietarios y ordeñadores de las Fincas por su valiosa y desinteresada participación y sobre todo por compartir con nosotros sus saberes.

Este proyecto fue financiado por el Comité para el desarrollo de la investigación de la Universidad de Antioquia, CODI, según Acta 299 de abril 28 de 1998.

Referencias

- Allende R, Sepúlveda L, Alonso A, Rangel Filho F. Desarrollo de una prueba de ELISA para identificar anticuerpos antiviral de Estomatitis Vesicular Indiana-3. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 58:55-62, 1992.
- Anuario Estadístico de Antioquia. Gobernación de Antioquia. 1992.
- Arbeláez G, Ariza F, Orjuela J. Inmunidad humoral en bovinos vacunados contra estomatitis vesicular New Jersey, utilizando vacuna oleosa inactivada. Revista ICA, vol.28, enero-marzo 1993.
- Arbeláez G, Pineda A, Quintero M y Sánchez C. Estomatitis Vesicular en Colombia. 1989-1994. Acovez, junio 1995.
- Arbeláez G, Rocha J y Orrego A. Avances en las investigaciones sobre la Estomatitis Vesicular en Colombia. 1º Ed. Bogotá D.E., octubre 1987.
- Atwill ER, Rodríguez LL, Hird DW, Rojas O. Environmental and host factors associated with seropositivity to New Jersey and Indiana Vesicular Stomatitis viruses in Costa Rican cattle. Preventive veterinary Medicine, 15 (1993).
- Gonzalez G. Studies of certain biological characteristics of colombian strains of Vesicular Stomatitis virus. Dissertation abstracts international, vol XXXVIII, no. 9, 1978.
- Leman A. Diseases of Swine. 7th edition. 1994.
- Liu I, Chung Zee Y. The pathogenesis of vesicular stomatitis virus, serotype Indiana, in Aedes Aegypti mosquitoes. Intrathoracic Injection. Am. J Trop. Med. Hyg. Vol.25, No.1, 1976.
- Mead D, et al. Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. Science vol.287, 21. January, 2000. 485-487.
- Nichol S. Molecular epizootiology and evolution of vesicular stomatitis virus New Nersey. Journal of Virology. Vol. 61, No.4, apr. 1987.
- Orrego A, Gallo-Cardona A, Abad JC, y col. Impacto económico de la Estomatitis Vesicular bovina en un hato lechero de la zona cafetera. Cenicafé, No.139, marzo 1988.
- Proceedings of an International conference on Vesicular Stomatitis. Mexico city, 24-27 September 1984.
- Rodríguez L, Bunch T, Paire M, Llewellyn. Re-emergence of Vesicular Stomatitis in the western United States is

- associated with distinct viral genetic lineages. *Virology* 270.2000.
15. Tesh R, Chaniotis B, Johnson K. Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): Transovarial transmission by Phlebotomine sand flies. *Science*, Vol.175, March 1972. 1477-1479.
 16. Tesh R, Peralta P and Johnson K. Ecologic studies of vesicular stomatitis virus, Results of experimental infection in Panamanian wild animals. *Am. J. of Epidemiology*. Vol.91, No.2.1970.
 17. Vanleeuwen JA, Rodríguez LL, Waltner-Toews D. Cow, farm, and ecologic risk factors of clinical vesicular stomatitis on Costa Rican dairy farms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(4), 1995.
 18. Young DG and Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst. (Gainesville)* 54: 1-881. 1994.
 19. Yuill TM. Vesicular Stomatitis. Department of Veterinary Medicine, Ed. University of Wisconsin. 1996.
 20. Zuluaga FN, Yuill TM. Estudios ecológicos de la Estomatitis Vesicular en Antioquia, Colombia. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 87(5). 1979.