

# Design of recombinant vaccines for Gumboro, Newcastle and Avian Infectious Laryngotracheitis<sup>x</sup>

*Diseño de vacunas recombinantes en las enfermedades de Gumboro, Newcastle y Laringotraqueítis Infecciosa Aviar*

*Desenho de vacinas recombinantes nas doenças de Gumboro, Newcastle e Laringotraqueite infecciosa aviar*

Andrés Felipe Santander Torres<sup>1</sup>, MV, MSc(c); Diana Claudia Marcela Álvarez Espejo<sup>2</sup>, MV, MSc; Javier Andrés Jaimes-Olaya<sup>3</sup>, MV, MSc, MBA; Arlen Patricia Gómez Ramírez<sup>4</sup>, MV, PhD; Luis Carlos Villamil Jiménez<sup>5\*</sup>, MV, MSc, PhD.

*\*Autor para correspondencia: Luis Carlos Villamil Jiménez. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Cr. 7 No. 172-85 Bogotá, Colombia. E-mail: [luvillamil@unisalle.edu.co](mailto:luvillamil@unisalle.edu.co)*

<sup>1</sup>Estudiante Maestría en Ciencias Veterinarias. Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia. <sup>2</sup>Investigadora. Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia. <sup>3</sup>Docente asistente, Programa de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia. <sup>4</sup>Docente asociada, Programa de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia. <sup>5\*</sup>Docente titular, Programa de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Cr. 7 No. 172-85 Bogotá, Colombia. Email: [luvillamil@unisalle.edu.co](mailto:luvillamil@unisalle.edu.co)

*(Recibido: 22 de enero, 2014; aceptado: 10 de octubre, 2014)*

## Abstract

The poultry industry worldwide has experienced significant growth in recent years. Likewise, the Colombian poultry sector has become a dynamic and promising industry with high yields and a significant share of the gross domestic product (GDP). However, this development has not been exempt of threats and challenges. Two of the biggest challenges faced by the industry are the prevention and control of infectious diseases and the safety of poultry products. In recent years, major efforts have focused on the control of infectious agents that cause economic losses by implementing prophylactic plans with safe, effective and practical vaccines. These immunizing inocula have changed with genetic engineering developments resulting in the design of recombinant DNA vaccines.

<sup>x</sup>Para citar este artículo: Santander Torres AF, Álvarez Espejo DCM, Jaimes-Olaya JA, Gómez Ramírez AP, Villamil Jiménez LC. Diseño de vacunas recombinantes en las enfermedades de Gumboro, Newcastle y Laringotraqueítis Infecciosa Aviar. Rev CES Med Zootec. 2014; Vol 9(2): 262-280.

This article provides an update on the design of recombinant vaccines and their use for controlling Gumboro, Newcastle and avian infectious laryngotracheitis. It addresses issues such as poultry vaccination principles, description and application of immunogens, and the advantages and disadvantages of this group of vaccines.

## Key words

*Avian infectious laryngotracheitis, Gumboro disease, poultry, Newcastle disease, recombinant vaccines.*

## Resumen

La industria avícola ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años a nivel mundial. Igualmente, el sector avícola colombiano se ha consolidado como una industria dinámica y promisorio con altos rendimientos y una importante participación en el producto interno bruto (PIB). Sin embargo, este desarrollo se ha afectado por las amenazas o los retos a los que la avicultura se enfrenta. Dos de los grandes desafíos que esta industria debe enfrentar son la prevención y el control de las enfermedades infecciosas y la inocuidad de los productos avícolas. En los últimos años, los mayores esfuerzos se han centrado en el control de los agentes infecciosos causantes de pérdidas económicas por medio del uso de planes profilácticos con biológicos seguros, eficaces y prácticos. Estos inóculos usados para la inmunización se han modificado con la evolución de la ingeniería genética dando como resultado el diseño de vacunas de ADN recombinante. En este artículo se presenta una actualización sobre el diseño de las vacunas recombinantes y su uso para el control de las enfermedades de Gumboro, Newcastle y laringotraqueítis infecciosa aviar, abordando temas asociados con los principios de la vacunación en avicultura, la descripción y la aplicación de este tipo de inmunógenos, así como las ventajas y las desventajas de dicho grupo de vacunas.

## Palabras clave

*Avicultura, enfermedad de Gumboro, enfermedad de Newcastle, Laringotraqueítis Infecciosa Aviar, vacunas recombinantes.*

## Resumo

A indústria avícola tem experimentado um crescimento significativo nos últimos anos ao redor do mundo. Igualmente, o setor avícola colombiano tem se consolidado como uma indústria dinâmica e promissória com maiores rendimentos e uma importante participação no produto interno bruto (PIB). Embora, este desenvolvimento tem se visto afetado pelas ameaças ou os desafios que apresenta a avicultura. Dois dos grandes desafios que esta indústria tem que enfrentar são a prevenção e o controle das doenças infecciosas e a inocuidade dos produtos avícolas. Nos últimos anos, os maiores esforços têm se centrado no controle de agentes infecciosos causantes de perdas econômicas por médio do uso de planos profiláticos com biológicos seguros, eficazes e práticos. Esses inóculos usados para a imunização tem sido modificados com a evolução da engenharia genética gerando como resultado o desenho de vacinas de DNA recombinante. Neste artigo, apresenta-se uma atualização sobre o desenho de vacinas recombinantes e sua utilização para o controle das doenças: Gumboro, Newcastle e Laringotraqueite infecciosa aviar, abordando temas associados com os princípios de vacinação em avicultura, a descrição e aplicação deste tipo de imunógenos, assim como as vantagens e desvantagens deste grupo de vacinas.

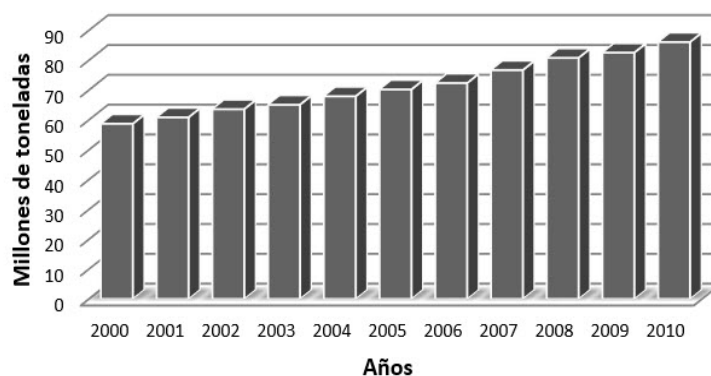
## Palabras-chave

Avicultura, doença de Gumboro, doença de Newcastle, Laringotraqueite infecciosa aviar, vacinas recombinantes.

## Introducción

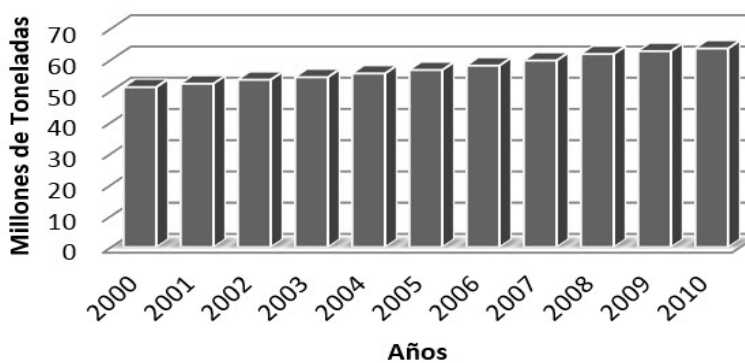
Desde hace más de 60 años, la producción avícola mundial ha experimentado un crecimiento de manera rápida y constante. Entre los años 2000 al 2010, la tasa de crecimiento anual en producción de carne de pollo y de huevo fue en promedio de 3,9 (Figura 1) y 2,1% (Figura 2), respectivamente <sup>97</sup>. En Colombia, el inicio de la avicultura comercial se presentó entre los años 1940 a 1960, época en la cual solo existían producciones de traspatio. Desde este periodo el progreso en el sector se ha presentado gracias a que los avicultores han

implementado estrategias de desarrollo, enfocadas principalmente en la comercialización, la integración vertical de la cadena productiva y la renovación tecnológica de las explotaciones <sup>80</sup>. Algunas zonas del país como Cundinamarca, Santander, Valle, Antioquia y Tolima poseen características aptas para la producción y la distribución de los productos avícolas, es por esto que estas regiones se han consolidado en las áreas de mayor productividad para los avicultores <sup>3, 5, 6</sup>.



Fuente: adaptado de Faostat (2012).

**Figura 1.** Producción mundial de carne de pollo entre los años 2000 – 2010.



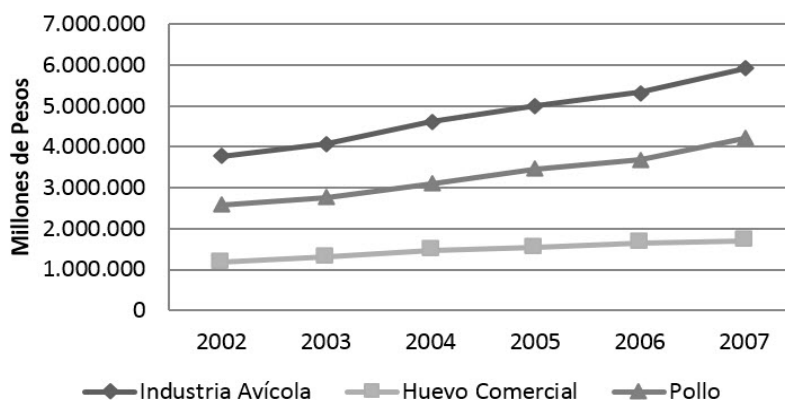
Fuente: adaptado de Faostat (2012).

**Figura 2.** Producción mundial de huevo de ponedora comercial entre los años 2000 – 2010.

La avicultura desempeña un papel fundamental en la economía colombiana, generando cerca de 240.000 empleos<sup>80</sup> y una alta participación en el producto interno bruto nacional (PIB) (Figura 3)<sup>3</sup>. En los últimos 20 años el sector avícola se ha consolidado en la producción pecuaria más dinámica dentro del país, con un crecimiento promedio del 6% entre los años 2006 a 2009<sup>81</sup>, 4,6 % en el año 2010 y 3,8 % en el 2011, posicionando al pollo como el tipo de carne con el mayor consumo per cápita de Colombia (Figura 4). En el 2012 se reportó un encasamiento de 633.399 pollos de engorde y 32.628.184 de ponedora comercial<sup>6,90,97</sup>, demostrando que en las últimas décadas Colombia ha seguido la tendencia mundial de crecimiento constante de la industria<sup>4, 86</sup>.

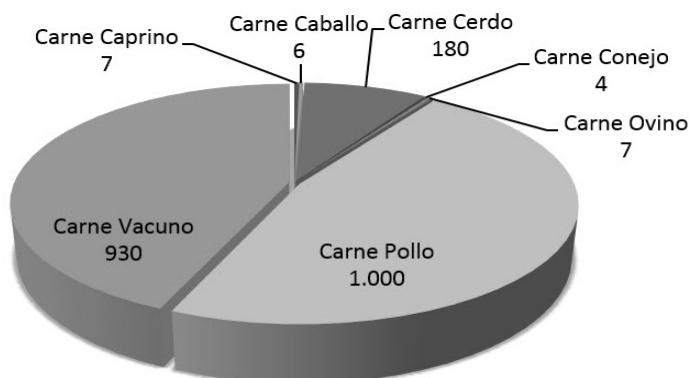
El crecimiento del sector se ha visto condicionado por dos aspectos de importancia: la sanidad de la producción aviar y la inocuidad de los productos avícolas. Dentro del tema de sanidad cabe resaltar tres enfermedades de control

oficial: la influenza aviar (el país fue declarado libre por el Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, que efectuó la autodeclaración por medio de la Resolución 1610 de 2011), la enfermedad de Newcastle (endémica declarada de prioridad sanitaria en la Ley 1255 de 2008) y la Salmonelosis aviar (zoonótica). También existe el grupo de enfermedades que representan pérdidas económicas para los productores, tales como la enfermedad de Gumboro, la Micoplasmosis aviar, la Bronquitis Infecciosa, la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar, entre otras. En cuanto a la inocuidad de los productos, los datos son inciertos; el ICA cuenta con una normatividad vigente para el control de los residuos químicos, sin embargo no es común el uso de la caracterización de estos productos o de posibles patógenos, exceptuando a la *Salmonella* spp. en pollo crudo, la cual en algunos estudios se ha determinado una prevalencia cercana al 7%<sup>89</sup>.



Fuente: adaptado de Faostat (2011a).

**Figura 3.** PIB Avícola Nacional durante el periodo 2002 – 2007.



Fuente: adaptado de Faostat (2012).

**Figura 4.** Producción de cárnicos en Colombia (miles de toneladas) en el año 2010.

Entre las estrategias empleadas para la prevención y el control de las enfermedades infecciosas en la industria avícola están la bioseguridad y la vacunación; ésta última es importante dado que diversas enfermedades infecciosas tienen una distribución mundial o en el caso de algunos patógenos se transportan a través del aire (“*airborne pathogens*”), lo que dificulta su control incluso con medidas de bioseguridad<sup>21</sup>. Adicionalmente, se debe considerar que las características de algunos virus pueden modificar la respuesta a los desinfectantes utilizados en las granjas. Los derivados fenólicos poseen un efecto limitado sobre virus desnudos, mientras que se ha demostrado que la cetrimida, el cloruro de benzalconio, la clorhexidina y el yodo povidona si son efectivos contra virus como el de la inmunodeficiencia humana y el Herpes Virus tipo 1<sup>95</sup>. En el caso del virus de la enfermedad de Gumboro se ha reportado la baja sensibilidad a procesos de eliminación con éter, cloroformo y fenol y a desinfectantes como amonios cuaternarios. La formalina al 0,5 % y los yodados son capaces de reducir la infectividad del virus pero no lo elimina, lo cual ha favorecido su persistencia en las granjas<sup>58</sup>.

A pesar de la continua implementación de las estrategias mencionadas anteriormente, se siguen presentando brotes de algunas enfermedades infecciosas en las aves comerciales. Es por esto que el estudio de los agentes infecciosos y su neutralización o atenuación ha continuado a través de los años. Los recientes avances en la biología molecular, la ingeniería genética recombinante y la inmunología han generado un cambio en el diseño de vacunas empleadas en medicina veterinaria, mejorando de forma significativa la seguridad, la eficacia y el costo de las mismas<sup>8,98</sup>. Es así como actualmente se reconocen tres generaciones en el diseño de inmunógenos. Las vacunas de primera generación son aquellas que requieren el cultivo de los agentes patógenos, los cuales son administrados en forma atenuada (vacunas vivas atenuadas) o inerte (vacunas muertas o inactivadas). Las vacunas de segunda generación se producen utilizando sólo la parte específica del patógeno que estimula la respuesta inmune, mientras que las de tercera generación utilizan el ADN de los agentes de manera directa o indirecta en un virus o una bacteria recombinante.

Dentro de estas nuevas generaciones de biológicos se incluyen vacunas de péptidos sintéticos (secuencias de aminoácidos de proteínas antigénicas), vacunas antiidiotipo

(anticuerpos que reproducen la morfología del antígeno), vacunas de proteínas y péptidos recombinantes (a través de la producción de proteínas por inserción del ADN en sistemas de expresión como bacterias) y vacunas génicas (material genético del patógeno como ADN desnudo o en vectores víricos o bacterianos)<sup>57,65,67</sup>. En la industria avícola se han empleado de forma rutinaria las vacunas de primera generación; sin embargo, en la actualidad se está implementado el uso de los biológicos de tercera generación como las vacunas de ADN recombinante.

En algunos estudios realizados en países como China, Bélgica, Italia, Francia y Estados Unidos, se presentan resultados relacionados con los porcentajes de cobertura de aves vacunadas con este tipo de biológicos. En el estudio de Rong *et al.* en el 2007 se utilizó una vacuna recombinante con la proteína VP2 contra la enfermedad de Gumboro, donde la tasa de protección medida a través de la detección de anticuerpos osciló entre 72 y 95%. De la misma manera, otro estudio en campo en el que se comparó la efectividad de una vacuna recombinante comercial contra la misma enfermedad (Vaxxitek<sup>®</sup>) frente a vacunas tradicionales elaboradas con cepas intermedias, se evidenció que los títulos de anticuerpos se mantuvieron altos (>6.000) en los grupos que recibieron la vacuna recombinante. En contraste, los títulos de anticuerpos fueron bajos (<4.000) en aves vacunadas con las cepas intermedias, los cuales sólo aumentaron después del día 42<sup>77</sup>. Este tipo de investigaciones no han sido exclusivas para la enfermedad de Gumboro, en estudios similares se obtuvieron seroconversiones y respuestas inmunes efectivas frente a retos en el 75 al 92% de las aves para el caso de vacunas recombinantes contra laringotraqueítis infecciosa aviar<sup>91</sup> y del 70% cuando se emplearon vacunas recombinantes para el control de la enfermedad de Newcastle<sup>80</sup>.

El uso de este tipo de vacunas se ha extendido en el país, sin embargo aún se desconocen algunos aspectos relacionados con la tecnología utilizada y con los resultados de estos productos en campo. Por lo anterior, el objetivo de esta revisión de literatura es describir los principios y las aplicaciones de las vacunas de ADN recombinante diseñadas para el control de las enfermedades infecciosas en avicultura, haciendo énfasis en los estudios realizados con los virus de Gumboro, Newcastle y laringotraqueítis infecciosa aviar.

## Principios de la vacunación en avicultura

Para contrarrestar y disminuir la morbilidad y la mortalidad de las diferentes enfermedades infecciosas, existen diferentes métodos de intervención dentro de los cuales uno de los más exitosos ha sido la vacunación. Ésta se fundamenta en estimular la respuesta inmune natural que genera un microorganismo dentro del hospedero. La inoculación de estos agentes no debe causar enfermedad pero debe ser potente y eficaz. El conocimiento inmunológico es la base para la producción de diferentes tipos de vacunas, cada una con ventajas y desventajas ante los patógenos que combate<sup>98</sup>. Convencionalmente se consideraban vacunas aquellos biológicos elaborados a partir de patógenos atenuados (convertido en no patogénicos por pasajes simultáneos en huevos embrionados o cultivo de tejidos) o patógenos muertos (inactivados por calor o por desnaturalización química).

Las vacunas con agentes muertos son las menos utilizadas en el control de las enfermedades de origen viral en avicultura, ya que presentan una menor efectividad haciéndose necesarias dosis repetidas para estimular correctamente al sistema inmune, a pesar de su alto nivel de seguridad (entendida como la probabilidad de generar enfermedad por la vacunación). Sin embargo, las vacunas atenuadas también pueden presentar desventajas como el riesgo de revertir su patogenicidad, especialmente en individuos con compromiso inmunológico<sup>97, 91, 98</sup>.

Este evento se ha relacionado con la restitución de las mutaciones generadas durante el proceso de atenuación del virus parental, lo cual puede resultar en cambios del genotipo mutante al original<sup>18</sup>. También se ha reportado la reversión de la virulencia de cepas vacunales durante el proceso de replicación en el individuo o durante la diseminación del virus en la población vacunada<sup>59</sup>. En el caso de los virus ARN se reportan tasas altas de mutación por ciclo de replicación asociadas a la ARN polimerasa dependiente de ARN, lo cual se evidenció en los virus causantes de la estomatitis vesicular<sup>24</sup> y la enfermedad de Gumboro<sup>79</sup>.

En la industria avícola se hacen necesarios métodos efectivos de vacunación masiva con el fin de atenuar o disminuir los efectos de un patógeno específico que pueda afectar la producción de un lote de aves. Las vacunas con virus atenuados son las más utilizadas en

el sector, ya que presentan la versatilidad de diferentes medios de administración individual o colectiva<sup>97</sup>. Entre los métodos de administración individual se encuentran la gota ocular o nasal, la administración oral y la inyección subcutánea, intramuscular o *in ovo*. En los métodos masivos se destacan la administración en el agua de bebida y la aplicación por aspersión (*spray*)<sup>97</sup>.

Como se mencionó anteriormente, uno de los últimos avances en el campo de la vacunación en medicina humana y veterinaria corresponde al diseño de las vacunas de ADN recombinante. Este tipo de agentes inmunizantes presenta algunas de las características que son deseadas en un inmunógeno; entre éstas se destacan la generación de memoria inmunológica y la producción de inmunidad adaptativa. Otra característica relevante es la seguridad, debido a que no producen la enfermedad y los efectos secundarios generados por la vacunación son mínimos. También está la eficacia, debido a que protegen al individuo contra la enfermedad producida por el patógeno específico, y la practicidad ya que el costo de la vacuna es relativamente asequible, su estabilidad durante el almacenamiento es mayor y son consideradas de fácil administración<sup>26</sup>. En resumen, las vacunas de ADN recombinante tienen la ventaja de la seguridad de las vacunas inactivadas combinada con la eficacia de los inmunógenos vivos atenuados<sup>21</sup>. Con estas vacunas también se han probado otras formas de inmunización como la vacunación *in ovo*, especialmente para el control de las enfermedades de Marek y Gumboro, administrando el agente en huevos fértiles a través de la membrana corioalantoidea entre los días 17 y 19<sup>80, 92, 98</sup>.

A nivel mundial hasta el 2005, este tipo de vacunas solo estaba autorizado para prevenir el virus del oeste del Nilo en los caballos y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa del salmón<sup>89</sup>. Hoy en día se encuentran diferentes estudios enfocados a las vacunas de ADN recombinante en varias áreas y sobre diferentes enfermedades infecciosas. En avicultura se destaca su utilidad en la prevención y el control de los virus de la enfermedad de Gumboro, Newcastle y laringotraqueítis infecciosa aviar<sup>89, 98</sup>.

Sin embargo, estos estudios demuestran que los resultados para el control de patógenos son prometedores

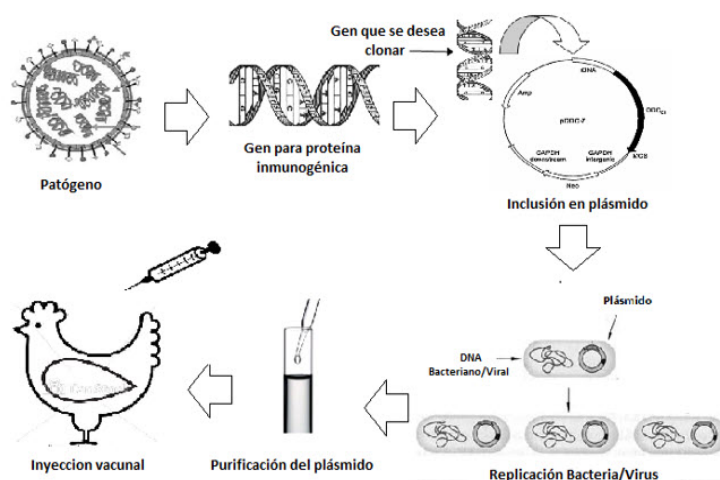
más no concluyentes, debido a que existen otros factores que pueden influenciar su efectividad. Lo anterior, justifica la realización de estudios que validen la forma como se realiza la evaluación de la eficiencia de este tipo de vacunas, debido a que cada inmunógeno recombinante posee una estructura diferente, así como una composición variable de los adyuvantes y diversas rutas de administración generando una respuesta inmune la cual no es predecible fácilmente<sup>85</sup>. Entre los factores que pueden influenciar su efectividad también se destaca el estado inmunológico de las aves en casos que exista inmunidad previa contra el vector viral, fallas humanas en la administración debido a que este tipo de vacunas comúnmente se aplican *in ovo* mediante procedimientos intensivos y el diseño del inmunógeno puesto que se reportan problemas de seguridad relacionados con la replicación del vector viral que pueden generar respuestas inmunológicas potentes similares al genotipo de origen y eventos de recombinación y/o reversión de la virulencia<sup>47</sup>.

### Vacunas de ADN recombinante y su aplicación en la industria avícola

Las vacunas de ADN recombinante están compuestas por organismos vivos los cuales han sido modificados, es decir

los genes virulentos han sido eliminados y reemplazados por genes de otros patógenos contra los cuales se desea inmunizar. Este tipo de vacunación se conoce también como “*carrier system*” debido al uso de un virus o una bacteria para llevar o transportar el antígeno del cual se quiere generar inmunidad<sup>89,97</sup>. El proceso para la realización de las vacunas de ADN recombinante consiste en una amplificación inicial del genoma del agente infeccioso a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el reconocimiento del gen que codifica la proteína inmunogénica, luego este fragmento se inserta dentro de un plásmido eucariota o en un virus apropiado para la expresión, la replicación o el clonaje de esta proteína en una bacteria. Por último se realiza la purificación de los plásmidos con las proteínas, las cuales se inoculan y generan una respuesta inmune al tener contacto con las células del hospedero (Figura 5)<sup>81,89,94</sup>.

Cada microorganismo usado como vector para la creación de vacunas de ADN recombinante posee características específicas que le permiten comportarse de diferentes maneras dentro del organismo. El herpesvirus de pavo (HVT por sus siglas en inglés *Herpesvirus of Turkey*) es uno de los virus más utilizados para la elaboración de estos biológicos, teniendo como particularidad la latencia y la habilidad de reactivarse sin importar la respuesta



**Figura 5.** Principios de vacunas recombinantes. Fuente: Adaptado de: Oshop et al., 2002.

adaptativa inmunológica específica del hospedero. Así mismo todos los virus de la familia *Herpesviridae* poseen un genoma de tamaño grande, con la opción de ampliarse mediante la inclusión de fragmentos de otros agentes. Adicionalmente estos virus poseen genes de virulencia que no son esenciales para su replicación *in vitro* e *in vivo*, los cuales son importantes para convertirlos en potenciales vectores para las vacunas<sup>11,12</sup>. Es por esto que el HVT se replica constantemente expresando el antígeno y re-estimulando al sistema inmunitario<sup>98</sup>.

Entre las ventajas que presenta este tipo de vacunación se encuentran:

1. La disminución de la presentación de reacciones posvacunales. Lo anterior se evidenció posterior a la aplicación de una vacuna recombinante contra la enfermedad de Gumboro, la cual no generó lesiones en la bursa de Fabricio en comparación con las vacunas vivas atenuadas<sup>44</sup>.
2. La disminución en la interferencia inmunológica que se puede presentar al inocular otras vacunas; esta es una consecuencia de la liberación constante del virus vacunal cuando se usan vectores como el HVT.

En algunos casos, se evita la necesidad de revacunación<sup>97</sup>.

3. La inducción de respuestas de tipo humoral y celular con la producción sistémica de células T y células CD4 y CD8<sup>47</sup>. En vectores virales como *Vaccinia* y *poxvirus* la respuesta inmune es de tipo celular con la producción de linfocitos T citotóxicos (LTc) y ayudadores (LTh). En el caso del *Adenovirus* se presenta respuesta inmune de tipo humoral con formación de anticuerpos y celular con LTh; los *Alfavirus* y *Poliovirus* estimulan la producción de anticuerpos y LTc, mientras que los *herpesvirus* solo estimulan la generación de anticuerpos<sup>87</sup>.

Dentro de las desventajas de este tipo de vacunas se incluyen:

1. Una menor protección inicial, por tener una respuesta inmunológica lenta adicional a una duración de inmunidad desconocida.
2. En algunos casos, biológicos generados contra la

laringotraqueítis infecciosa aviar/viruela, pueden llegar a causar neumonía en los animales a los cuales se les administra la vacuna<sup>97</sup>.

3. La respuesta inmune de tipo adaptativo puede reducir o bloquear la generación de la respuesta contra el antígeno vacunal<sup>47</sup>.

En el ámbito mundial, existen diversos grupos de investigación que se dedican al estudio de las aplicaciones y la eficacia de las vacunas recombinantes elaboradas con diferentes cepas del mismo patógeno. Las pruebas realizadas en Australia, Brasil, China, Europa, Norte América y otros lugares del mundo demuestran las ventajas e intentan encontrar los posibles efectos adversos que estos nuevos biológicos pueden causar en los individuos en los que se administran. Los resultados de estos estudios han permitido el desarrollo de diversas combinaciones de vectores y agentes para la generación de vacunas de ADN recombinante eficaces y seguras. El estudio de las vacunas basadas en ADN ha evolucionado desde la vacuna contra la hepatitis B creada con plasma humano en 1976 hasta lograr la disponibilidad comercial de vacunas recombinantes seguras en vectores como los *Poxvirus*<sup>89, 89, 97</sup>.

En avicultura algunas de estas mezclas genéticas se han diseñado para la prevención de diferentes enfermedades como la enfermedad de Gumboro, la laringotraqueítis infecciosa aviar y la enfermedad de Newcastle. Igualmente se han desarrollado vacunas de ADN recombinante para el control de dos agentes etiológicos en un mismo biológico como es el caso de la vacuna de ADN recombinante para la influenza aviar combinada con la laringotraqueítis infecciosa aviar, y la enfermedad de Marek junto a la influenza aviar. Estas vacunas han sido diseñadas en agentes replicadores donde los más comunes son *Salmonella entérica*, el adenovirus y el HVT<sup>80,89, 96</sup>.

La entrada de estos biológicos a Colombia fue autorizada después de una extensa revisión por los entes de control. Luego de pasar las pruebas de bioseguridad comprobando que tienen mínimas probabilidades de reversión a un estado virulento del agente, se les permitió la entrada y posterior comercialización previa solicitud de las compañías farmacéuticas y de biológicos solicitantes<sup>89,90</sup>. Actualmente Colombia cuenta con la comercialización de ocho vacunas recombinantes, de las cuales tres son



para uso avícola y están indicadas en el control de las enfermedades de Gumboro, laringotraqueítis infecciosa aviar, Newcastle y Marek usando como vector el HVT<sup>81</sup>. A continuación se realiza una descripción de tres de estos agentes infecciosos y del uso de vacunas de ADN recombinante para la prevención de los mismos.

### Enfermedad de Gumboro

La enfermedad de Gumboro (IBD por sus siglas en inglés *Infectious Bursal Disease*) es causada por un virus de la familia *Birnaviridae*, género *Avibirnavirus* el cual posee dos serotipos (1 y 2); los miembros de esta familia poseen un genoma que consiste en dos segmentos de una doble cadena de RNA<sup>2, 80, 81</sup>. Es un virión sin envoltura (desnudo) con nucleocápside de simetría icosaédrica y un diámetro que varía entre 55 – 65 nm<sup>1, 84</sup>, características que confieren resistencia al medio ambiente y una alta variabilidad genética y antigénica del virus<sup>84</sup>. El genoma viral posee dos segmentos (A y B); el segmento A tiene 2 marcos de lectura abierta (ORF), codificando el primer fragmento para las proteínas estructurales entre las que se encuentran las proteínas virales VP2 (por sus siglas en inglés *viral protein*), VP3, VP4 y otras proteínas precursoras como la VPX, y el segundo para la proteína VP5<sup>84, 81</sup>. La VP2 se reconoce como la principal proteína antigénica del virus<sup>89, 94</sup>.

Este agente es de gran importancia económica para la industria avícola, debido a que afecta al sistema inmunológico de las aves generando una tasa alta de mortalidad causada por infecciones secundarias<sup>90</sup>. El virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV por sus siglas en inglés *Infectious Bursal Disease Virus*) tiene tropismo por linfocitos B, principalmente en la bursa de Fabricio, lo cual genera un estado de inmunosupresión predisponiendo al hospedero a infecciones por microorganismos oportunistas y a respuestas deficientes ante los planes profilácticos vacunales<sup>89, 89, 90</sup>. La infección con el IBDV en aves menores de tres semanas de edad puede causar daño severo en la bursa de Fabricio, caracterizado por la depleción de células B que expresan IgM lo cual afecta la respuesta primaria de anticuerpos. En pollitos de un día de edad se reportó la disminución de células B en el bazo<sup>83</sup>. La bursa de Fabricio puede regenerarse por proliferación de linfocitos, en contraste con la respuesta primaria de anticuerpos la cual permanece disminuida durante 7 semanas post infección y es dependiente de la edad de las aves y la virulencia de la cepa<sup>93</sup>. Se ha

reportado que la regeneración de este órgano se relaciona con el desarrollo de folículos formados después de la recuperación del ave<sup>83</sup>.

Desde hace más de treinta años se han utilizado las vacunas vivas atenuadas para el control del IBDV<sup>89, 98, 98</sup>. Sin embargo, el surgimiento de nuevas cepas del agente con mayor potencial patogénico como lo son las de tipo muy virulento (vv por sus siglas en inglés *very virulent*), descubiertas en Europa y Reino Unido en 1987, sumado a la continua aparición de cepas variantes no han permitido una protección completa ante los brotes de campo con las vacunas convencionales permitiendo la introducción y el uso de las vacunas de ADN recombinante en la práctica<sup>84, 89</sup>. En Colombia, la enfermedad de Gumboro es considerada endémica, presentándose brotes con cepas de tipo muy virulento (vvIBDV), las cuales pueden generar mortalidades entre el 60 y 100%<sup>10, 68, 78</sup>. Norte de Santander ha sido una de las regiones más afectadas por cepas muy virulentas, donde el laboratorio regional del ICA reportó 26 casos de virus muy virulento en el año 2003 y 25 casos en el año 2004, con una mortalidad promedio del 17 y 14% respectivamente<sup>60, 68</sup>.

Para el diseño de las vacunas de ADN recombinante para el control del IBDV se ha utilizado de forma común el HVT como vector de la proteína VP2<sup>80, 90, 84</sup>. También se ha utilizado el poxvirus como vector de la misma, desarrollando la vacuna de ADN recombinante fpIBD1<sup>84</sup>. En estudios realizados por Villegas *et al.* en 2008, se utilizó la levadura *Pichia pastoris* como vector de la proteína VP2 obtenida de la cepa Edgar de la enfermedad de Gumboro. En este trabajo se emplearon aves libres de patógenos específicos (SPF por sus siglas en inglés *Specific Patogen Free*) las cuales fueron vacunadas con diferentes productos y desafiadas con la cepa homóloga (cepa Edgar), para evaluar la protección desarrollada frente al agente. En el grupo inmunizado con la vacuna de ADN recombinante no se observó morbilidad o mortalidad, obteniendo un mejor resultado comparada con el 30% de mortalidad obtenido en las aves vacunadas con la región hipervariable de la proteína (hvVP2) y con el 90% de mortalidad observado en los controles no vacunados y desafiados<sup>80, 94</sup>.

En otra investigación en aves SPF se comprobó la efectividad de otra vacuna de ADN recombinante utilizando el HVT como vector de la VP2 proveniente de una cepa estándar del IBDV (cepa Faragher 52/70).

Para la evaluación de la efectividad de este biológico, se analizaron los valores de la proporción entre el peso corporal y el peso de la bursa, y los hallazgos histopatológicos en los principales órganos linfoides. Después de la inmunización, las aves fueron infectadas con la variante E del IBDV. Las aves vacunadas demostraron una adecuada protección e inmunocompetencia por los índices de la bursa significativamente mayores a los del grupo control, indicando que la infección no indujo daños tisulares ni involución de la bolsa de Fabricio. Adicionalmente no se observaron signos clínicos postdesafío en las aves que se vacunaron a los 18 y 28 días de edad. Estos resultados demuestran que incluso usando una vacuna recombinante con un segmento del genoma (VP2) que pertenece a una cepa estándar del patógeno, se confiere protección contra variantes específicas de la enfermedad (variante E) <sup>97</sup>. En el estudio realizado por Villegas *et al.* (2008) se obtuvieron resultados similares a los de las investigaciones realizadas por Perozo *et al.* (2009), donde el grupo de aves vacunadas con la proteína VP2 completa alcanzaron índices de la bursa significativamente mayores que las aves no vacunadas o vacunadas con la porción hipervariable hvVP2 del agente <sup>94</sup>.

En el estudio realizado por Le Gros *et al.* en el 2009 se probó la efectividad de las vacunas de ADN recombinante para el control de la enfermedad de Gumboro utilizando dos grupos de pollos de engorde. En el primer grupo se administró una vacuna recombinante vía subcutánea a pollitos de un día, mientras que en el segundo se suministró una vacuna viva atenuada a los 17 y 24 días de edad vía oral. En los días 26 y 45 se realizó la titulación de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Gumboro mediante el uso de dos kits comerciales de ELISA. En los días seleccionados, los títulos de anticuerpos en el primer grupo fueron significativamente mayores a los del segundo <sup>98</sup>.

Así mismo se ha evaluado la eficacia de la proteína VP2 expresada en *Escherichia coli* para proteger del IBDV. En un ensayo realizado por Omar *et al.* en el 2006 solo el 10% de los pollos que no recibieron ninguna medida preventiva sobrevivió a la exposición al agente. Este estudio también comparó diferentes tipos de inmunización para conocer los porcentajes de supervivencia de los individuos, obteniendo como resultado que la totalidad de las aves inmunizadas con IBDV inactivado con calor sobrevivió, el 57% de los animales vacunados con 150 µg de proteína VP2 cruda lograron combatir

la infección y el menor porcentaje de sobrevivencia lo obtuvo el grupo vacunado con proteína recombinante de *E. coli* con una efectividad reportada del 28% <sup>92</sup>. De la misma forma algunas pruebas realizadas previamente sobre la proteína VP2 en vacunas recombinantes usando como vector *E. coli*, confirman la capacidad de inducir síntesis de anticuerpos contra IBDV. Sin embargo, estos anticuerpos generados por la inmunización reaccionan específicamente con partes virales desnaturalizadas y no contra el virus completo o intacto <sup>92,98</sup>.

A pesar de que la proteína vírica VP2 del IBDV ha sido expresada en diferentes agentes (*E. coli*, virus de la viruela aviar o poxvirus, vaculovirus, levaduras, virus de la enfermedad de Marek, entre otros), aún no existe una vacuna recombinante líder en el ámbito comercial <sup>81,84</sup>. Esto se debe posiblemente a su efectividad variable, lo cual hace necesario la aplicación en conjunto con vacunas vivas atenuadas.

#### *Laringotraqueítis Infecciosa Aviar*

El virus de la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar (ILTV por sus siglas en inglés *Infectious Laryngotracheitis Virus*) pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Iltovirus*, especie *Gallid Herpesvirus 1*, el cual afecta a ponedoras y pollos de engorde principalmente, causándoles graves afecciones respiratorias que pueden terminar con la muerte <sup>9,97,81</sup>. La fase inicial de la enfermedad dura de 1 a 2 semanas donde se pueden observar problemas con el crecimiento, así como en la producción de huevo o signos relacionados a las vías respiratorias como el jadeo, la tos, la expectoración de moco con sangre y otros como la depresión y la conjuntivitis. Luego de esta fase el hospedero pasa a ser un portador latente asintomático <sup>90,97</sup>.

El genoma del virus está conformado por una doble cadena lineal de ADN con dos regiones únicas ( $U_L$  y  $U_S$ ) y dos secuencias repetidas inversas (IR y TR). Estas estructuras permiten la formación de dos isómeros del genoma con diferente orientación; la región  $U_S$  se ha encontrado y reconocido en diferentes alphaherpesvirus. Adicionalmente la codificación y la síntesis de glicoproteínas homólogas como gB, gC, gH, gI, gJ, gN, gM, gD, gE, gF, gG, gK y gL ocurren en la región específica  $U_S$  de genes conservados del ILTV <sup>81</sup>.

Dentro de las vacunas más usadas para la inmunización en granjas, se encuentran las vacunas con virus vivo atenuado. Estos preparados son altamente eficaces pero poco seguros, debido al potencial de latencia del ILTV, por lo que se han asociado con una serie de efectos adversos, como es la diseminación de cepas vacunales a galpones no vacunados (virulencia residual). Para evitar estas posibles complicaciones con las vacunas convencionales, se ha propuesto la eliminación de la glicoproteína B (gB) en los virus atenuados, ya que se ha identificado como la principal proteína con potencial de virulencia expresada luego de la inmunización. Otras proteínas que se expresan con la administración de vacunas vivas atenuadas son gJ, gD, gI y gN<sup>81,84,97</sup>.

En cuanto a las vacunas de ADN recombinante desarrolladas para el control de esta enfermedad, se ha utilizado comúnmente como vector el HVT, con el cual la acción de la respuesta inmune celular y humoral es generada por la glicoproteína B (gB) altamente conservadas en los herpesvirus, otorgando una mejor respuesta antigénica contra el gen de ILTV insertado en este vector. También se han generado mezclas de gB e interleucina – 18 de pollo con el genoma del ILTV en mezclas conocidas como vectores de expresión bicistrónicos para aumentar la respuesta de células T, siendo de mayor eficiencia por promover una respuesta inmunológica sinérgica<sup>97</sup>.

Entre las ventajas del uso de inmunógenos recombinantes en el control del ILTV se encuentran la expresión simultánea de dos genes de glicoproteínas (gI y gD), dando como resultado una protección del 97% de las aves vacunadas con una sola dosis administrada vía *in ovo*<sup>97</sup>. También se ha demostrado que las vacunas recombinantes no afectan el rendimiento de las aves, no causan reacciones posvacunales y no hay posibilidad de reversión de la virulencia. Adicionalmente estas vacunas pueden ser administradas *in ovo* a los 18 días en los embriones o al nacimiento por vía subcutánea<sup>80,97</sup>.

En un estudio realizado para evaluar la forma de administración de las vacunas de ADN recombinante para contrarrestar el ILTV se diseñaron tres experimentos con una vacuna que usa como vector el HVT y que contiene las glicoproteínas I y D; en el experimento 1 se utilizaron aves SPF a las cuales se les inoculó vía *in ovo* el biológico; en el experimento 2 la aplicación de la vacuna se realizó el primer día de vida de las aves SPF, por último en el

experimento tres se siguió el procedimiento de vacunación de la misma manera que en el grupo experimental anterior pero con aves comerciales. Los resultados que presentó esta investigación fueron variables, debido a que la detección del ADN de la vacuna (rHVT-LT) en tejidos de los animales sacrificados estuvo entre el 80 y 100% en el caso de las aves de los experimentos 1 y 2, a diferencia del experimento tres en el cual las muestras positivas no superó el 50% pudiéndose atribuir a la interacción con anticuerpos maternos<sup>97,81</sup>.

En otro estudio se conformaron cuatro grupos experimentales cada uno con 10 aves SPF y 20 aves comerciales, los cuales recibieron los siguientes tratamientos: grupo 1 no vacunado (grupo control), grupo 2 vacunados con rFPV-ILTVgB (vacuna recombinante con vector poxvirus), grupo 3 inmunizados con vacuna comercial contra ILTV y grupo 4 vacunados con FPV 017 (cepa vacunal de viruela aviar). De la semana 1 a la 6 las aves no presentaron signos clínicos respiratorios. A la semana 6 todos los grupos fueron desafiados con una dosis letal de ILTV, encontrándose una mortalidad del 100% en las aves SPF sin importar el biológico usado, aunque en los animales comerciales la efectividad del inóculo comercial fue de 85% y de la vacuna vectorizada del 100%<sup>90</sup>.

Asimismo, en otras investigaciones se compararon dos vacunas vivas atenuadas aplicadas a dosis completa con una vacuna vectorizada administrada a dosis media en aves comerciales. Las vacunas tradicionales se administraron a los 14 días de edad por medio de gota ocular y la vacuna recombinante se aplicó vía *in ovo* y subcutánea al nacimiento. Los animales fueron desafiados con el ILTV (cepa virulenta aislada de campo 63140) a los 35 y 57 días de edad. Se analizaron diferentes variables observándose que la ganancia de peso diario fue menor en los animales vacunados *in ovo* en comparación con las aves inmunizados tradicionalmente, así como los anticuerpos específicos contra la proteína gI y gB fueron mejor expresados en los animales inmunizados con vacunas de ADN (75-92%) en comparación con los animales vacunados tradicionalmente (8%)<sup>91</sup>. Los resultados a pesar de ser positivos exigen un mayor análisis y posiblemente un mayor número de estudios que evalúen los métodos de inmunización y los planes vacunales con los cuales se optimice el uso de este tipo de biológicos.

## Enfermedad de Newcastle

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV por sus siglas en inglés *Newcastle Disease Virus*) posee un genoma RNA y pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Avulavirus*. El NDV contiene seis genes principales los cuales codifican para las proteínas estructurales y dos proteínas no estructurales W y V generadas por la modificación transcripcional de RNAm que codifica para una proteína estructural; es un virus de morfología casi esférica con un diámetro entre 100 a 500 nm en el cual en ocasiones es posible observar partículas de filamentos con un tamaño cercano a los 100 nm. El virión está envuelto con una membrana de bicapa lipídica integrada con dos glicoproteínas diferentes: una hemaglutinina - neuroaminidasa (HN) la cual posee actividades tanto de hemaglutinina (HA) a causa de la absorción del virus por receptores específicos en los glóbulos rojos (permite identificación del agente), como de neuroaminidasa (NA) generada por la hidrólisis de la unión entre los ácidos neuroamínicos en el hospedero.

La segunda glicoproteína es la de fusión (F) encargada de determinar la virulencia del agente (cepas de alta y baja virulencia). Luego de la membrana lipídica está ubicada una proteína relativamente hidrófoba y no glicosilada llamada de matriz (M) la cual desempeña un papel importante en el ensamblaje del virus mediante la interacción con la nucleocápside, la bicapa lipídica y las regiones de las glicoproteínas de superficie que se encuentran en la parte interna de la membrana<sup>96</sup>. Las proteínas no estructurales pueden resultar de una diferencia en la iniciación o la transcripción del gen P del RNAm. Según la severidad de la presentación, la enfermedad se clasifica en 3 patotipos: lentogénica o respiratoria, mesogénica y velogénica (viscerotrópico - Forma Doyle; Neurotrópico - Forma Beach)<sup>1,88</sup>.

Este virus es de importancia económica en la avicultura mundial por su elevada morbilidad y mortalidad, las bajas tasas en la producción así como por los altos costos que representa su prevención y tratamiento derivado de las enfermedades concomitantes que se pueden presentar<sup>80</sup>, por estas razones se requiere un estricto control a través de la vacunación o el establecimiento de protocolos de cuarentena al presentarse los brotes<sup>89</sup>. La enfermedad se ha detectado en todo el mundo, aunque actualmente está controlada en aves domésticas en países como

Canadá, Estados Unidos y parte de Europa occidental, con una continua presentación en partes de África, Asia y Sudamérica<sup>90</sup>. No obstante, según esta misma fuente, países como Chile, Argentina y Brasil no presentan brotes de Newcastle al menos desde enero de 2005. Las cepas velogénicas son endémicas en Asia, Medio Oriente, África, América Central, América del Sur y algunas regiones de México, en contraste con las cepas virulentas que se encuentran en EE.UU y Canadá las cuales están endémicas solo en animales silvestres. Así mismo las cepas lentogénicas se encuentran en aves de corral en todo el mundo, al igual que las cepas mesogénicas siendo poco frecuentes<sup>98</sup>. En Colombia, los primeros casos de la enfermedad de Newcastle fueron reportados en junio de 1950, desde entonces la enfermedad se considera endémica, presentando focos que alcanzan un total de 394 casos en todo el territorio nacional desde el 2006 hasta el 2009<sup>80,89</sup>. En el 2008 el Congreso de Colombia declaró el control y la erradicación del NDV como prioridad sanitaria, convirtiéndose en una patología de interés social-nacional<sup>80</sup>.

La vacunación contra la enfermedad de Newcastle ha tenido un impacto positivo desde 1940, por lo que se considera la primera medida para el control y la erradicación de la enfermedad. La mayoría de las vacunas se elaboran con las cepas lentogénicas (LaSota o B1) o mesogénicas (Beaudette o VG/GA) producidas en huevos SPF. En pollos de engorde frecuentemente se administra una vacuna antes de que el individuo sea expuesto a una cepa de campo, debido a que estas pueden ser más agresivas y los títulos de anticuerpos que se generan pueden interferir con la inmunidad que provee la vacuna<sup>7,90</sup>. En Colombia existen tres vacunas de ADN recombinante contra la enfermedad de Newcastle aprobadas para la administración en aves comerciales<sup>81</sup>.

A lo largo de los años se han realizado varios estudios con el fin de conocer las ventajas y las desventajas del uso de las vacunas de ADN recombinante contra el NDV<sup>97,98,80,81</sup>. En un estudio en el que se administró una vacuna de ADN recombinante diseñada con el virus de viruela como vector, se observó que el 90% de los pollos que fueron inmunizados obtuvieron inmunidad protectora; adicionalmente se estableció que la vía intraocular fue la mejor alternativa para la administración de este tipo de vacunas<sup>7,81,89</sup>.

En otro estudio en pollos de engorde, se emplearon los virus de la influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle

para la creación de un biológico vectorizado. Luego de una inmunización con este biológico se desafiaron las aves con virus de alta patogenicidad (influenza aviar) y de patotipo velogénico viscerotrópico (enfermedad de Newcastle) conociendo previamente el nivel de los anticuerpos maternos. Luego del periodo de evaluación se obtuvo como resultado la protección del 100% de las aves vacunados con rNDV-LS/AI-H5<sup>90, 82</sup>.

En otro estudio se diseñó una vacuna recombinante a partir de la cepa LaSota de la enfermedad de Newcastle como vector para la expresión de la glicoproteína (G) del subgrupo C del metapneumovirus (MPV por sus siglas en inglés *metapneumovirus* - aMPV-C), generando así una vacuna bivalente. La expresión de la proteína G se detectó por inmunofluorescencia en células infectadas *in vitro*. A los animales en los que se probó esta vacuna, se les administró una dosis única de la vacuna rLS/aMPV-C G. Los resultados demostraron que la cepa LaSota del NDV es un vector seguro y eficaz para la expresión de la proteína G del aMPV-C. De igual forma luego de un desafío con un patotipo velogénico de la enfermedad de Newcastle se comprobó la protección completa contra el NDV y una protección parcial contra aMPV-C induciendo respuestas inmunes moderados pero específicas contra estos agentes<sup>97, 99</sup>.

Rauw *et al.* en el 2010 no solo experimentó con vacunas recombinantes, sino que propuso como coadyuvante las vacunas vivas atenuadas. El experimento se realizó con cuatro grupos organizados así: un grupo fue inmunizado con la vacuna recombinante *in ovo* y el otro grupo se quedó sin tratamiento (grupo control). En el día de la eclosión cada grupo se dividió en dos, los grupos 1 y 2 fueron los originalmente no tratados mientras que los grupos 3 y 4 fueron los vacunados vía *in ovo*. A las aves de los grupos 2 y 4 se les administró una vacuna viva atenuada contra NDV vía oculo-nasal. Luego del desafío con la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacan del NDV, los resultados mostraron que las aves no inmunizadas murieron al día 6, mientras que las aves vacunadas con la combinación rHVT-ND/vacuna atenuada estaban totalmente protegidas, sin evidenciar morbilidad ni mortalidad. El grupo inmunizado solo con la vacuna viva atenuada tuvo un porcentaje de sobrevivencia entre el 80 y el 90% mientras que los animales que recibieron el rHVT-ND solo el 70% obtuvo protección. A pesar de los resultados variables de las investigaciones que utilizan las vacunas de ADN recombinante para el control del

NDV, es necesario realizar nuevos estudios que permitan evaluar la eficacia de este tipo de vacunas en el sector avícola.

## Conclusiones

La avicultura es una industria de crecimiento constante, el cual está sujeto a dos aspectos de importancia: la inocuidad de los productos avícolas y la sanidad de la producción aviar. Uno de los principales factores que frena el desarrollo del sector son las pérdidas económicas por brotes de enfermedades infecciosas, para las cuales entre las estrategias más adecuadas para su control y prevención se encuentran las medidas de bioseguridad y la vacunación. Con la evolución de las áreas del conocimiento y sus diferentes aplicaciones, se han desarrollado nuevas técnicas para la creación y el mejoramiento de las vacunas disponibles en el mercado como las recombinantes, teniendo como meta una mayor eficacia, seguridad y practicidad. Actualmente Colombia cuenta con la comercialización de ocho vacunas recombinantes, de las cuales cuatro son para uso avícola en el control de las enfermedades de Gumboro, laringotraqueítis infecciosa aviar, Newcastle y Marek. Aunque estos inmunógenos tienen la ventaja de la seguridad de las vacunas inactivadas combinada con la eficacia de las vacunas vivas atenuadas, requieren de estudios futuros que permitan evaluar y cuantificar sus ventajas y desventajas especialmente en el ámbito colombiano.

Es necesario tener en cuenta que estos nuevos desarrollos en tecnologías vacunales, deben acompañarse de una infraestructura diagnóstica que responda a la posibilidad de evaluar la efectividad de este tipo de biológicos debido a que en diversos contextos el estado inmunitario de los lotes no se evalúa a satisfacción, las coberturas vacunales son diversas y el concepto de riesgo no es claro. Luego del análisis de la información, se concluye que las vacunas recombinantes se proyectan para ofrecer una alta efectividad, sin embargo se siguen presentando incógnitas al momento de usarlas, debido a que existen otros factores como la respuesta inmune y el diseño mismo de las vacunas, los cuales pueden influenciar el comportamiento y la efectividad de las mismas. Por último, se hace evidente la necesidad de continuar la investigación en el área avícola, para optimizar los métodos e inóculos que se usan para la prevención de enfermedades infecciosas teniendo en cuenta los retos de

campo, la normatividad del país, los requerimientos de la industria y los costos de producción.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al estudiante Víctor Valencia Castaño y a los Doctores Jaime Romero, Efraín Benavides y Diego Soler del Programa de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle por el apoyo en el marco del proyecto titulado: “Evaluación de la vacunación como estrategia para el control de las enfermedades virales en explotaciones avícolas” financiado por Colciencias (Código 1243-521-28381).

## Referencias

1. Alexander, D. Newcastle y otras infecciones por paramyxoviridae. En Diseases of poultry, Calnek, B. Editorial Manual Moderno; 2000. Segunda edición.
2. Alfonso, J. Reovirus y Birnavirus. En: Manual de Microbiología Veterinaria. Editado por Vadillo, S., S. Píriz, E. Mateos. Primera edición. McGraw – Hill Interamericana; 2002. 639 – 650.
3. Avicultores. Indicadores avícolas. Federación Nacional de Avicultores de Colombia – Fenavi, 2011a. Edición 189.
4. Avicultores. Indicadores avícolas. Federación Nacional de Avicultores de Colombia – Fenavi, 2011b. Edición 190.
5. Avicultores. Indicadores avícolas. Revista Avicultores. Revista de la Federación Nacional de Avicultores de Colombia – Fenavi 2012; 202:46-48.
6. Avicultores. Indicadores avícolas. Revista Avicultores. Revista de la Federación Nacional de Avicultores de Colombia – Fenavi 2013; 207:46-48.
7. Awan, M. A. Otte, M. J. James, A. D. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. Avian Pathol 1994; 23:405-423.
8. Babiuk, L. A. Gomis, S. Hecker, R. Molecular Approaches to Disease Control. Poult Sci 2003; 82:870–875.
9. Bagust, T. Guy, J. Laringotraqueítis. En Diseases of poultry, Calnek, B. Editorial Manual Moderno; 2000. Segunda edición.
10. Banda, A. y Villegas P. (2004). “Genetic Characterization of Very Virulent Infectious Bursal Disease Viruses from Latin America”. Avian Diseases 48: 540-549.
11. Bråve A, Ljungberg K, Wahren B, Liu MA. Vaccine delivery methods using viral vectors. Mol Pharm. 2007 Jan-Feb;4(1):18-32.
12. Brown, M. Skinner, M. Coding sequences of both genome segments of a European ‘very virulent’ infectious bursal disease virus. Virus Res 1996; 40:1-15.
13. Brun, Alejandro. Albina, Emmanuel. Barret, Tom. Chapman, David A.G. Czub, Markus. Dixon, Linda K. Keil, Gunther M. Klonjowski, Bernard. Le Potier, Marie-Frederique. Libeau, Genevieve. Ortego, Javier. Richardson, Jennifer . Takamatsu, Haru-H. Antigen delivery systems for veterinary vaccine development Viral-vector based delivery systems. Vaccine 26 (2008) 6508–6528
14. Bublot, M. Pritchard, N. Le Gros, F.-X. Goutebroze, S. Use of a Vectored Vaccine against Infectious Bursal Disease of Chickens in the Face of High-Titred Maternally Derived Antibody. J Comp Path 2007; 137:S81-S84.
15. Chen, H. Zhao, L. Wei, Z. Cui, B. Wang, Z. Li, X. Xia, P. Liu, J. Enhancement of the immunogenicity of an infectious laryngotracheitis virus ADN vaccine by a bicistronic plasmid encoding glycoprotein B and interleukin-18. Antiviral Res 2010; 87:235–241.
16. CONPES 3468. Política nacional de sanidad e inocuidad para la cadena avícola, 2007. Versión aprobada.

17. Corbanie, E. Development of a dry powder vaccine for mass vaccination of poultry. Thesis submitted to obtain the degree of Doctor in pharmaceutical sciences. Faculty of pharmaceutical sciences. Ghent University 2007.
18. Condit, R. Principles of virology. In D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman & S.E. Straus (Eds.), *Fields Virology*, 4th edn (pp. 19-51). 2001. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
19. Cottinghama, M. Carroll, M. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine* 2013; 6;31(39):4247-51.
20. Creelan, J. Calvert, V. Graham, D. McCullough, S. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Pathol* 2006; 35:173-179.
21. Cserep, T. Vaccines and vaccination in poultry diseases. Editado por Pattison, M. McMullin, P. Bradburry, J. Alexander, D. Sixth edition Elsevier. 2008.
22. Devlin, J. Browning, G. Hartley, C. Gilkerson, J. Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine. *Vaccine* 2007; 25:3561-3566.
23. Diallo, I. Taylor, J. Gibson, J. Hoad, J. Jong, A. Hewitson, G. Corney, B. Rodwell, B. Diagnosis of a naturally occurring dual infection of layer chickens with fowlpox virus and gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus). *Avian Pathol* 2010; 39:25-30.
24. Eigen, M. Natural selection: a phase transition? *Biophysical Chemistry*. 2000. 85, 101-123.
25. Faostat Food and agriculture organization of the united nations. (2012). Producción. Ganadería. Online <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>.
26. Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello, y A. M. Skalka. Principles of virology. 2004. Segunda edición. ASM Press. Pp 918.
27. Francois, A. Chevalier, C. Delmas, B. Eterradossi, N. Toquin, D. Rivallan, G. Langlois, P. Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* 2004; 22:2351-2360.
28. Fuchs, W. Veits, J. Helferich, D. Granzow, H. Teifke, J. Mettenleiter, T. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet Res* 2007; 38:261-279.
29. Gao, H. Li, K. Gao, L. Qi, X. Gao, Y. Qin, L. Wang, Y. Wang, X. ADN prime-protein boost vaccination enhances protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Microbiol* 2013; 164:9-17.
30. García, M. Volkening, J. Riblet, S. Spatz, S. Genomic sequence analysis of the United States infectious laryngotracheitis vaccine strains chicken embryo origin (CEO) and tissue culture origin (TCO). *Virology* 2013; 440:64-74.
31. Gimeno, I. Cortes, A. Guy, J. Turpin, E. Williams, C. Replication of recombinant herpesvirus of turkey expressing genes of infectious laryngotracheitis virus in specific pathogen free and broiler chickens following in ovo and subcutaneous vaccination. *Avian Pathol* 2011; 40:395-403.
32. Gómez, E. Lucero, M. Zotha, S. Carballeda, J. Gravisaco, M. Berinstein, A. Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against Infectious Bursal Disease Virus. *Vaccine* 2013; 31:2623-2627.
33. Gómez, M. Cabal, M. Torres, J. Private initiatives on food safety: the case of the Colombian poultry industry. *Food Control* 2002; 13:83-86.
34. González, M. Coroas, L. Fernández, A. Noda, J. Perera, C. Ramos, E. Alfonso, P. Obtención de una cepa viral recombinante FowlPox - Gumboro. *Revista Salud Animal*. 2003; 25:20-26.

35. Guérin, N. History of vaccination: from empiricism towards recombinant vaccines. *Rev Med Interne* 2007; 28:3–8.
36. Hardin, Y. Palya, V. Cazaban, C. Lozano, F. Alva, B. Moore, K. Vaccines and vaccinations against Gumboro Disease: The key points. *Memories of XXII latin America poultry congress 2011*. Buenos Aires, Argentina.
37. Hu, H. Roth, J. Estevez, C. Zsak, L. Liub, B. Yu, Q. Generation and evaluation of a recombinant Newcastle disease virus expressing the glycoprotein (G) of avian metapneumovirus subgroup C as a bivalent vaccine in turkeys. *Vaccine* 2011; 29:8624–8633.
38. Huang, Z. Elankumaran, S. Panda, A. Samal, S. K. Recombinant Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector. *Poult Sci* 2003; 82:899–906.
39. ICA Instituto Colombiano Agropecuario. Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. Subgerencia de protección animal. *Produmedios* 2009; Primera edición.
40. ICA Instituto Colombiano Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. Productos biológicos con registro vigente a 15 marzo de 2011. Subgerencia de Protección Animal Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios.
41. ICA Instituto Colombiano Agropecuario. Resolución número 1250 de 2010. Gerente general encargado: José Sanmiguel.
42. ICA Instituto Colombiano Agropecuario. Resolución número 1253 de 2010. Gerente general encargado: José Sanmiguel.
43. Imler, J. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* 1995; 13:1143–1151.
44. Iowa State University., OIE. Enfermedad de Newcastle Infección por Paramixovirus Aviar, Infección por Paramixovirus del Ganso 2008. Disponible online en: [www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad\\_de\\_newcastle.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad_de_newcastle.pdf). Última consulta, Febrero 2012.
45. Jaimes-Olaya, J. A., Álvarez, D. C., Jaime, J., Vera V. J. Aspectos determinantes en la presentación de la enfermedad infecciosa de la bursa. *Revista de Medicina Veterinaria Universidad de La Salle* 2009; Vol. 17: 11 – 22.
46. Jaimes-Olaya, J. A., Gómez, A. P., Álvarez, D. C., Soler, D., Romero, J. R., Villamil, L. C. Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria Universidad de La Salle* 2010; Vol. 20:49 – 61.
47. Jacquet, A. Recombinant Vaccines. 2011. Disponible en: [http://grad.md.chula.ac.th/english/data/PEP\\_2011\\_13\\_Recombinant%20vaccine\\_secure.pdf](http://grad.md.chula.ac.th/english/data/PEP_2011_13_Recombinant%20vaccine_secure.pdf)
48. Jiao, H. Pan, Z. Yin, Y. Geng, S. Sun, L. Jiao, X. Oral and Nasal ADN Vaccines Delivered by Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Induce a Protective Immune Response against Infectious Bronchitis in Chickens. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18:1041–1045.
49. Johnson, M. Pooley, C. Ignjatovic, J. Tyack, S. A recombinant fowl adenovirus expressing the *S1* gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 2003; 21:2730–2736.
50. Krishnan, B. Current status of ADN vaccines in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 43:3–11.
51. Le Gros, F.X. Dancer, A. Giacomini, C. Pizzoni, L. Bublot, M. Grazianic, M. Prandini, F. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 2009; 27:592–596.
52. Lee, K. Lillehoj, H. Jang, S. Pagès, M. Bautista, D. Pope, C. Ritter, D. Lillehoj, E. Neumann, A. Siragusa, G. Effects of *in ovo* vaccination and anticoccidials on the distribution of *Eimeria* spp. in poultry litter and serum antibody titers against coccidia in broiler chickens raised on the used litters. *Res Vet Sci* 2012; 93:177–182.
53. Legionea, A. Coppoa, M. Lee, S. Noormohammadib, A. Hartleya, C. Browninga, G. Gilkersona, J. O'Rourkeb, D. Devlina, J. Safety and vaccine



- efficacy of a glycoprotein G deficient strain of infectious laryngotracheitis virus delivered *in ovo*. *Vaccine* 2012; 30:7193–7198.
54. Li, K. Gao, H. Gao, L. Qi, X. Gao, Y. Qin, L. Wang, Y. Wang, Y. Adjuvant effects of interleukin-18 in ADN vaccination against infectious bursal disease virus in chickens. *Vaccine* 2013; 31:799– 1805.
55. Li, Y. Reddy, K. Reid, S. Cox, W. Brown, I. Britton, P. Nair, V. Iqbal, M. Recombinant herpesvirus of turkeys as a vector-based vaccine against highly pathogenic H7N1 avian influenza and Marek's disease. *Vaccine* 2011; 29:8257– 8266.
56. Liu, J. Chen, P. Jiang, Y. Deng, G. Shi, J. Wu, L. Lin, Y. Bu, Z. Chen, H. Recombinant duck enteritis virus works as a single-dose vaccine in broilers providing rapid protection against H5N1 influenza infection. *Antiviral Res* 2012; 97:329–333.
57. Lopez, M. Mallorquin, P. Pardo, R. Vega, M. Vacunas de nueva generación informe de vigilancia tecnologica. Fundación Española para el desarrollo de la investigación genómica y proteómica. 2004.
58. Lukert, P., Saif, Y. Infectious Bursal Disease. En: *Diseases of Poultry*. Editado por Y. Saif. Undécima edición. Iowa State Press. 2003. Páginas 161–179.
59. MacLachlan, J., Dubovi, E. Antiviral Immunity and Prophylaxis. In: *Fenner's Veterinary Virology*. Fourth Edition. Academic Press London NW1 7BY, UK. 2011. Pp. 87 – 92.
60. Mateus, H. Desplazamiento de Gumboro muy virulento: experiencia Colombiana- Norte De Santander. Universidad Nacional de Colombia- Universidad Francisco de Paula Santander. (2005).
61. Mebatsion T. Melson, L. Hein, R. A Novel HVT-Based Recombinant Vaccine (INNOVAX-ILT) to Simultaneously Control Infectious Laryngotracheitis and Marek's Disease in Chickens 2008. *Memorias del 23rd World Poultry Congress*. Brisbane, Australia.
62. Meulemans, G. Letellier, C. Gonze, M. Carlier, M.C. Burny, A. Newcastle disease virus f glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathol* 1988; 17:821-82.
63. Mojica, A. Paredes, J. Características del Sector Avícola Colombiano y su Reciente Evolucion en el Departamento de Santander. *Ensayos Sobre Economía Regional* 2005. Centro Regional de estudios Económicos Bucaramanga.
64. Müller, H., Islam, Md. R., Raue, R. Research on infectious bursal disease- the past, the present and the future. *Vet Microbiol* 2003; 97:153-165.
65. Nascimento, I.P. and Leite, L.C.C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res*, December 2012, Volume 45(12) 1102-1111
66. Negash, T. Liman, M. Rautenschlein, S. Mucosal application of cationic poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles as carriers of ADN vaccine and adjuvants to protect chickens against infectious bursal disease. *Vaccine* 2013; 31:3656– 3662.
67. O'Hagan, D. *New Generation Vaccine Adjuvants*. Novartis Vaccines and Diagnostics Inc. 2007. Siena, Italy. doi: 10.1002/9780470015902.a0020177
68. Ochoa, L., Osorio, N. H., Palya, V. y Gardin, Y. Presencia del virus muy virulento de enfermedad infecciosa de la bolsa (vvIBDV) en Colombia. *Revista Plumazos* 23. (2005): 10-14.
69. OIE World Organisation for Animal Health. Boletín n. 2010 – 4. 78.a Sesión General: un fortalecimiento estratégico 2010. Página 47.
70. OIE World Organisation for Animal Health. Fichas de información general sobre enfermedades animales enfermedad de Newcastle 2011. Disponible online en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/NEWCAS-ES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/NEWCAS-ES.pdf). Última consulta, Febrero 2012.

71. Oldoni, I. García, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol* 2007; 36:167-176.
72. Omar, A.R. Kim, C.L. Bejo, M.H. Ideris, A. Efficacy of VP2 protein expressed in *E. coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *J Vet Sci* 2006; 7:241-247.
73. Oshop, G.L. Elankumaran, S. Heckert, R.A. ADN vaccination in the avian. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 89:1-12.
74. Pavlova, S. Veits, J. Mettenleiter, T. Fuchs, W. Live vaccination with an H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype. *Vaccine* 2009; 27:5085-5090.
75. Perozo, F. Villegas, A.P. Fernandez, R. Cruz, J. Pritchard, N. Efficacy of single dose recombinant herpesvirus of turkey infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination against a variant IBDV strain. *Avian Dis* 2009; 53:624-628.
76. Pitcovski, J. Gutter, B. Gallili, G. Goldway, M. Perelman, B. Gross, G. Krispel, S. Barbakov, M. Michael, A. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 2003; 21:4736-4743.
77. Prandini, F. Bublot, M. Le Gros, F.-X. Dancer, A. Pizzoni, L. Lamichhane. C. Assessment of the immune response in broilers and pullets using two ELISA kits after in ovo or day-old vaccination with a vectored HVT + IBD vaccine (VAXXITEK® HVT+IBD). *Zootecnia internacional* (2008) 21:19.
78. Pulido, M. y Villegas, P. (2006). "Mesa de discusión sobre la problemática sanitaria actual". *Revista Plumazos*.
79. Raue, R., Islam, M. R., Islam, M. N. , Islam, K. M. Badhy, S. C., Das, P. M., Muller, H. Reversion of molecularly engineered, partially attenuated, very virulent infectious bursal disease virus during infection of commercial chickens. *Avian Pathology* 2004. 33(2), 18 – 189.
80. Rauw, F. Gardin, Y. Palya, V. Anbari, S. Lemaire, S. Boschmans, M. Berg, T. Lambrecht, B. Improved vaccination against Newcastle disease by an in ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old. *Vaccine* 2010; 28:823-833.
81. Reddy, S.K. Sharma, J.M. Ahmad, J. Reddy, D.N. McMillent, J.K. Cookf, S.M. Wild, M.A. Schwartz, R.D. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an irz ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine* 1996; 14:469-477.
82. Sarfati-Mizrahi, D. Lozano-Dubernard, B. Soto-Priante, E. Castro-Peralta, F. Flores-Castro, R. Loza-Rubio, E. Gay-Gutiérrez, M. Protective Dose of a Recombinant Newcastle Disease LaSota-Avian Influenza Virus H5 Vaccine Against H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease Virus in Broilers with High Maternal Antibody Levels. *Avian Dis* 2010; 54:239-241.
83. Schat, K., Skinner, M. Avian Immunosuppressive Diseases and Immune Evasion. En: *Avian Immunology*. Edited by Fred Davison, Bernd Kaspers, Karel A. Schat. Academic Press . London WC1X 8RR, UK. First edition 2008. Pp 301 – 303.
84. Shaw, I. Davison, T.F. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine* 2000; 18:3230-3241.
85. Soler, E., Houdebine, L. Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnology Annual Review*. Volume 13. 2007. . Pages 65-94.

86. Soriano, J. La producción avícola en Colombia. Connotaciones. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Colombia sede Medellín 2003.
87. Souza, A., Haut, L., Reyes-Sandoval, A. Pinto, A. Recombinant viruses as vaccine against viral diseases. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2005. 38: 509-522.
88. Takaaki, N. Cros, J. Park, M. Nakaya, Y. Zheng, H. Sagrera, A. Villar, E. García-Sastre, A. Palese, P. Recombinant Newcastle Disease virus as a vaccine vector. J Virol 2001; 75:11868-11875.
89. Taylor, J. Edbauer, C. Rey-Senelonge, A. Bouquet, J. F. Norton, E. Goebel, S. Desmettre, P. Paoletti, E. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. J Virol 1990; 64:1441-1450.
90. Tong, G. Zhang, S. Meng, S. Wang, L. Qiu, H. Wang, Y. Yu, L. Wang, M. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. Avian Pathol 2011; 30:143–148.
91. Vagnozzi, A. Zavala, G. Riblet, S. Mundt, A. García, M. Protection induced by commercially available liveattenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. Avian Pathol 2012; 41:21-31.
92. Vermeulen, B. De Backer, P. Remon, J.P. Drug administration to poultry. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54:795–803.
93. Vervelde, L. and Davison, T.F. Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. 1997. Avian Pathol. 26, 803–821.
94. Villegas, P. Hamoud, M. Purvis, L.B. Perozo, F. Infectious bursal disease subunit vaccination. Avian Dis 2008; 52:670-674.
95. Wood, A. and Payne, D. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. Jounnul of Hospital Infwtion (1998) 38, 283-295.
96. Yusoff, K. Tan, W. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. Avian Pathol 2001; 30:439– 455.
97. Zavala, G. Estrategias en el control de Laringotraqueítis infecciosa. Memorias del 22rd Latin America Poultry Congress 2011. Buenos Aires, Argentina. Disponible online <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/laringotraqueítis-infecciosa-t3643/165-p0.htm>
98. Zepp, F. Principles of vaccine design—Lessons from nature. Vaccine 2010; 28S;C14–C24.
99. Zhou, H. Min, J. Zhao, Q. Gu, Q. Cong, H. Li, Y. He, S. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a recombinant ADN vaccine with a novel genetic adjuvant. Vaccine 2012; 30:1800–1806