

Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas

L. Salleras

Director general de Salud Pública. Departamento de Sanidad y Seguridad Social de la Generalitat de Catalunya

Introducción

Para la mayoría de las enfermedades, la forma más efectiva de inmunidad específica es la que se desarrolla después de padecer la infección clínica o inaparente¹. El objetivo de la vacunación es precisamente desarrollar en el huésped que la recibe una inmunidad adquirida activa similar a la conferida por la infección natural clínica o inaparente, pero sin presentar el cuadro clínico y sin molestias o reacciones o, por lo menos, con unas molestias o reacciones suficientemente débiles para que sean aceptables por el individuo vacunado¹⁻³. Para conseguirlo se administran al huésped susceptible productos inmunizantes obtenidos mediante las diferentes tecnologías de producción de vacunas, con el fin de estimular una respuesta inmunitaria específica de tipo humoral, celular o de ambos tipos según la infección, que le proteja frente al agente infeccioso específico en el futuro¹⁻⁵.

Clasificación de las tecnologías de producción de vacunas

Según su composición, las vacunas pueden clasificarse en vivas, inactivadas y génicas⁶⁻¹⁷. Las primeras consisten en microorganismos vivos atenuados por diferentes procedimientos⁷⁻¹⁰. Los agentes inmunizantes pueden replicarse en el huésped vacunado al que inmunizan sin causarle la enfermedad natural. Las inactivadas contienen microorganismos enteros inactivados o sus subunidades inmunógenas⁷⁻¹³. Actúan como antígenos inmunógenos no replicantes. En las vacunas génicas no se inyecta el microorganismo o sus fracciones inmunógenas, sino el gen que codifica para la proteína inmunizante¹⁴⁻¹⁷.

Ellis divide las tecnologías de producción de vacunas en clásicas y modernas^{4,5}. Las tecnologías clásicas incluyen los procedimientos utilizados hasta muy recientemente para la obtención de las vacunas vivas atenuadas (variantes de otras especies; pases sucesivos en cultivos celulares o medios de cultivo) y de las vacunas inactivadas enteras o de sus fracciones o subunidades inmunóge-

nas naturales (inactivación por procedimientos físicos o químicos). Los nuevos métodos de producción de vacunas consiguen patógenos atenuados por diferentes procedimientos (atenuación molecular, selección de mutantes sensibles a la temperatura, reasortado de virus), etc., utilizan la tecnología de ADN recombinante para la obtención de proteínas inmunizantes, expresan proteínas inmunizantes en plantas a las que se ha introducido el gen que las codifica, conjugan polisacáridos capsulares con proteínas para convertirlos en T-dependientes o producen péptidos inmunizantes por síntesis química. Las vacunas génicas (vacunas a base de vectores vivos de genes, vacunas de ADN) utilizan las modernas técnicas de suministro de genes para la consecución de los mismos objetivos. Se trata de estimular en el huésped vacunado una respuesta inmunitaria específica que le proteja en el futuro frente al agente infeccioso correspondiente.

Algunos autores clasifican las vacunas génicas a base de vectores vivos de genes entre las vacunas vivas y las vacunas a base de plásmidos de ADN entre las vacunas inactivadas. En este caso, las vacunas se dividen sólo en dos grandes grupos: vivas atenuadas e inactivadas. En esta revisión se seguirá la primera de las clasificaciones, la más didáctica a nuestro juicio, ya que se hace en función del producto administrado (antígeno inmunógeno o gen) y del estado del microorganismo inmunizante (vivo atenuado o inactivado) cuando el producto inmunizante es un producto inmunógeno no génico¹.

En la tabla 1 se resumen los principales procedimientos clásicos y modernos de producción de vacunas. También se enumeran ejemplos de vacunas ya comercializadas obtenidas por unos u otros procedimientos y de vacunas en fase de investigación mediante las tecnologías modernas. Todas las vacunas clásicas citadas en la tabla 1 han sido comercializadas. De las vacunas producidas con tecnologías modernas sólo han sido comercializadas algunas de polisacáridos capsulares conjugadas con proteínas (*Haemophilus influenzae* tipo b, meningococo C, neumocócica 7-valente), de proteínas inmunizantes obtenidas por recombinación genética (hepatitis B, subunidad B de la toxina cólica, toxina pertúsica, enfermedad de Lyme) y de virus atenuados obtenidos por reasortado (rotavirus).

TABLA 1
Tecnologías de producción de vacunas

Clásicas
<i>Vacunas vivas atenuadas</i>
Virus patógenos en animales que no lo son para el hombre
Viruela, rotavirus
Pases sucesivos en medios de cultivo (bacterias) o cultivos celulares (virus), hasta la obtención de la atenuación
BCG
Sarampión, rubéola, parotiditis, varicela
<i>Vacunas inactivadas</i>
Inactivación por calor, formaldehído β -propiolactona o timerosal de bacterias o virus enteros
Tifoidea, cólera, polio tipo Salk, gripe inactivada
Inactivación por calor y formaldehído de antígenos secretados (toxinas)
Difteria
Tétanos
Toxina pertúsica
Obtención de fracciones inmunizantes virales o bacterianas naturales
AgHBs (hepatitis B plasmática)
Subunidades virales (gripe)
Polisacáridos capsulares (<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, meningococo A-C, neumococo)
Fracciones antigénicas de bacterias (tos ferina)
Modernas
<i>Vacunas vivas atenuadas</i>
Obtención de variedades <i>cold adapted</i>
Gripe
Virus reasortados (<i>reassorted virus</i>)
Rotavirus, gripe
Atenuación molecular de los patógenos
Tuberculosis, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
<i>Vacunas génicas</i>
Vectores vivos atenuados de genes, virales (poxvirus, adenovirus) o bacterianos (BCG, <i>Salmonella</i>)
Hepatitis B, gripe, herpes simple, polio, tuberculosis, VIH, <i>E. coli</i> enteropatógeno
Vacunas de ADN (plásmidos)
Malaria, sida, gripe, hepatitis B, herpes simple
<i>Vacunas inactivadas</i>
Conjugación de polisacáridos capsulares con proteínas
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b neumocócica heptavalente, meningocócica C
Obtención de antígenos inmunizantes por recombinación genética
Hepatitis B recombinante
Cólera (toxina B)
Toxina pertúsica
Enfermedad de Lyme
Expresión de proteínas inmunizantes en plantas (vacunas comestibles)
<i>E. coli</i> enterotoxigénico, hepatitis B, subunidades B de la toxina colérica
Obtención de antígenos inmunizantes por síntesis química (vacunas peptídicas)
Malaria

En la tabla 2 se comparan las principales características de los productos vacunales obtenidos con las principales tecnologías, clásicas y modernas, de producción de vacunas.

Tecnologías de producción de vacunas vivas atenuadas

Las vacunas vivas atenuadas son teóricamente las ideales, ya que dan lugar a una infección similar a la natural (los virus atenuados se replican en el organismo humano igual que los virus salvajes) con una reactogenicidad mínima. La respuesta inmunitaria es también similar a la de la infección natural (anticuerpos y linfocitos Tc), aunque de menor intensidad^{4,5}. La excepción es la vacuna BCG que sólo despierta inmunidad celular^{18,19}. En las vacunas virales vivas, la protección conferida es de larga duración, en general de por vida. El punto fundamental en estas vacunas es que la atenuación de la patogenicidad sea la adecuada: lo suficientemente intensa para que no se produzca el cuadro clínico, pero no tan completa como para que el producto no sea inmunógeno. En la tabla 3 se

presentan las principales diferencias entre las vacunas vivas atenuadas y las inactivadas.

Las variantes atenuadas se consiguen mediante diferentes procedimientos. El más clásico es la utilización de patógenos de otras especies que presenten inmunidad cruzada con el patógeno del hombre. Es el caso de la vacuna de la viruela²⁰. La consecución del cultivo de bacterias a finales del siglo pasado abrió el paso a la obtención de vacunas bacterianas vivas atenuadas mediante pases sucesivos en medios de cultivo *in vitro* (BCG)²⁰. En los años cincuenta, cuando se consiguieron por primera vez los cultivos celulares de virus, fue posible disminuir su patogenicidad mediante pases sucesivos en cultivos celulares hasta la obtención de la atenuación (vacunas de la polio oral, sarampión, rubéola, parotiditis y varicela)²⁰. Más recientemente se ha conseguido la atenuación molecular de los patógenos mediante métodos químicos y técnicas de recombinación genética^{4,5}.

Vacunas a base de variantes de otras especies

Se basan en la utilización de virus que causan en los animales enfermedades parecidas a las enfermedades humanas que se pretende prevenir y presentan inmunidad cruzada con el agente infeccioso que la causa. La idea es que el virus animal actúe como atenuado en los humanos pero desencadene una respuesta inmunitaria suficiente para la prevención de la enfermedad humana relacionada.

La vacuna de la viruela es el prototipo de esta clase de vacunas. Fue la primera vacuna utilizada^{17,20}. Jenner descubrió en 1796 que las ordeñadoras de las vacas contraían unas pústulas en las manos y quedaban protegidas frente a la viruela¹⁷. La inoculación de la secreción de las pústulas de la vaca en niños que no habían padecido la viruela les protegía de tal forma que no enfermaban al ser expuestos experimentalmente al virus o al llegar la epidemia. Se había descubierto la primera vacuna moderna. Posteriormente se supo que el virus de la viruela de las vacas (*cow pox*) es muy parecido al virus de la viruela y existe inmunidad cruzada entre ambos virus^{17,20}.

La primera vacuna de rotavirus también constaba de rotavirus animales de las vacas y los monos²¹. Pero, a diferencia de la vacuna de la viruela, esta vacuna no demostró suficiente poder inmunizante en humanos. Para conseguir una vacuna de rotavirus suficientemente inmunógena hubo que obtener un reasortado que contiene los segmentos del virus animal y los que codifican para la proteína de superficie del virus humano, que es el antígeno inmunizante.

Vacunas de virus vivos atenuados por pases sucesivos en cultivos celulares

Esta estrategia se hizo posible en los años cincuenta del pasado siglo con el advenimiento de los cultivos celulares²⁰. Para conseguir la atenuación el virus salvaje aislado de humanos se sometió a pases sucesivos *in vitro* en diferentes tipos de cultivos celulares, con el fin de atenuar su patogenicidad. En algunos casos, como en las vacunas de la polio oral, ha sido posible demostrar la atenuación en primates²². En la mayoría, no obstante (sarampión, rubéola, parotiditis, varicela), ha habido que probarla en ensayos en humanos, ya que no hay animales susceptibles²³.

TABLA 2

Características de las vacunas comercializadas y en fase de investigación obtenidas con tecnologías clásicas y modernas de producción de vacunas

Tecnologías de producción de la vacuna	Vacunas comercializadas			Vacunas en fase de investigación		
	Virus atenuados*	Inactivados*	Proteínas recombinantes**	Péptidos sintéticos**	Vectores vivos de genes**	Vacunas de ADN**
	<i>El agente patógeno es cultivado en condiciones anormales hasta obtener cepas no virulentas</i>	<i>El agente patógeno virulento es inactivado con productos químicos o calor</i>	<i>El gen que codifica la proteína inmunizante es expresado en levaduras, bacterias o células de mamíferos</i>	<i>Se sintetizan péptidos que incluyen los epítopes B y T inmunodominantes</i>	<i>Los genes que codifican los antígenos inmunizantes se insertan en el genoma de bacterias o virus atenuados</i>	<i>Los genes que codifican el antígeno inmunizante son insertados en un plásmido que actúa de vector</i>
Necesidad de dosis de refuerzo	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Posiblemente
Estabilidad relativa	No muy estable	Estable	Estable	Estable	No muy estable	Muy estable (incluso a elevada temperatura)
Tipo de respuesta inmunitaria	Humoral y celular	Humoral	Humoral	Humoral	Humoral y celular	Humoral y celular
Reversión	Puede revertir a la forma virulenta	No	No	No	El vector puede revertir a la forma virulenta	No
Adyuvantes	No	Sí	Sí	Sí	No	No
Vacunación neonatal	No	No	No	No	No	Sí

*Vacunas obtenidas con tecnologías clásicas. **Vacunas obtenidas con tecnologías modernas.

Estas vacunas están comercializadas desde hace años y han modificado radicalmente la epidemiología de las enfermedades que previenen. La viruela fue erradicada en 1979 y la poliomielitis lo será próximamente²⁴. La tercera enfermedad infecciosa transmisible erradicada en todo el mundo será con toda seguridad el sarampión²⁵.

Vacunas de bacterias vivas atenuadas por pases sucesivos en medios de cultivo

La única vacuna obtenida mediante esta técnica es la vacuna antituberculosa conocida como bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Esta vacuna contiene una cepa viva atenuada de bacilo *Mycobacterium bovis* obtenida en los años veinte después de 231 pases sucesivos *in vitro* durante 13 años en medios de cultivo a base de patata biliada²⁶.

De la cepa original hay diferentes cepas derivadas en distintos lugares del mundo con inmunogenicidad y tolerabilidad variables.

La eficacia o efectividad protectora conferida por la vacuna han variado ampliamente, según los estudios, desde el 0 al 80% de pro-

tección. Estas diferencias expresan probablemente distintas cepas vacunales y poblaciones en estudio²⁶.

Vacunas de bacterias vivas atenuadas mediante mutagénesis química

La única vacuna bacteriana viva atenuada obtenida mediante la atenuación por métodos químicos que ha sido comercializada es la vacuna antitifoidea oral viva atenuada Ty21a.

Esta vacuna se obtuvo a partir de la cepa salvaje Ty2 de *Salmonella typhi* tratada con el agente mutagénico químico nitroso-guanidina. Se seleccionó una mutante que presentaba ausencia completa de la actividad de la enzima uridindifosfato galactosa-4 epimerasa y una reducción en el 80% aproximadamente en la actividad de las enzimas galactocinasa y galactosa-1-fosfato uridil transferasa. Posteriormente se seleccionó una mutante que, además, carecía de antígeno Vi. A esta última cepa se la llamó Ty21a²⁷⁻³⁰.

Administrada por vía oral en forma líquida o en cápsulas, la vacuna Ty21a proporciona buenas respuestas inmunitarias humorales (IgA) y celulares (linfocitos Tc) a nivel de la mucosa intestinal, las cuales se cree que son las responsables de la protección frente a la fiebre tifoidea conferida por este tipo de vacuna. En cambio, la respuesta inmunitaria humoral en términos de anticuerpos circulantes parece ser modesta. Los anticuerpos IgG de las mucosas y la respuesta sistémica de linfocitos Tc parecen dirigidos en gran parte frente a los antígenos O y H, pero no frente al antígeno Vi (esta vacuna carece de dicho antígeno)²⁷⁻³⁰.

Los estudios de eficacia protectora han demostrado que esta vacuna proporciona elevados niveles de protección (70-90% según los estudios) que perduran un mínimo de 7 años³¹⁻³³.

Vacunas virales vivas a base de mutantes termosensibles y adaptados al frío

Estas vacunas se obtienen seleccionando mutantes en función de su capacidad de multiplicarse a temperaturas diferentes de la del cuerpo humano (mutantes sensibles a la temperatura o TS), más

TABLA 3

Características diferenciales de las vacunas vivas e inactivadas

Vacunas vivas^a
Deben ser atenuadas mediante pases en cultivos celulares
Se dan en una sola dosis ^b y la protección conferida es de larga duración
Son capaces de replicarse en el huésped (necesitan un menor número de microorganismos)
Tienden a ser menos estables
No requieren adyuvantes
Pueden administrarse a veces por vía natural
Inducen anticuerpos y respuestas de células T citotóxicas (Tc)
Existe la posibilidad de difusión de la infección entre los individuos no vacunados
Vacunas inactivadas
Pueden elaborarse a partir de microorganismos completamente virulentos
Se dan en dosis múltiples (la protección conferida es más corta y para mantenerla son necesarias revacunaciones)
Requieren adyuvantes muy a menudo
Por lo general, se administran por vía parenteral
Inducen sólo anticuerpos
No es posible la difusión de la infección a los no vacunados
Suelen ser menos reactógenas

^aVacunas virales atenuadas. ^bLa vacuna antipoliomielitis oral es una excepción. Cada dosis contiene los tres tipos de poliovirus, los cuales al replicarse en el intestino se interfieren mutuamente y con otros virus intestinales, por lo que deben administrarse como mínimo 3 dosis para asegurar una respuesta inmunológica adecuada para cada tipo (Tomada de Mins Cet al).

elevadas o más bajas (*cold adapted* o *CA*) que la del organismo humano (p. ej. seleccionando *in vitro* las que se multiplican a temperaturas $< 25^{\circ}\text{C}$)¹.

La idea es que los mutantes *CA* o *TS*, se replicarán con menos intensidad *in vivo* que sus respectivos virus parentales, con lo que serán fenotípicamente atenuados y menos virulentos sin perder su capacidad inmunógena.

Un mutante *CA* del virus de la gripe se ha probado en numerosos estudios y ha demostrado ser inmunógeno y eficaz. Reasortado con el virus salvaje que le aporta los genes que codifican la glucoproteína de superficie (antígeno inmunizante) constituye la base de las nuevas vacunas vivas inhaladas de la gripe, de próxima comercialización en los EE.UU.³⁴ (fig. 1).

También se ha obtenido una vacuna doble *TS* del virus respiratorio sincitial que ha sido probada con cierto éxito en los EE.UU. La doble *TS* garantiza una menor probabilidad de reversión a la patogenicidad que la *TS* simple³⁵.

Vacunas de virus vivos atenuados obtenidos por reasortado

Estas vacunas se obtienen por coinfección en cultivos celulares de dos virus con genomas diferentes. El nuevo virus contiene segmentos del genoma procedentes de uno de los virus y otros, del otro.

Se han utilizado para la obtención de vacunas vivas atenuadas frente al rotavirus³⁶. El virus reasortado contiene la mayoría de los genes de un rotavirus animal no patógeno para el hombre, lo que le proporciona la atenuación del fenotipo para los humanos, pero también el gen que codifica la proteína de superficie del rotavirus humano. Esta proteína es el antígeno inmunizante del virus frente al cual el virus reasortado da lugar a una respuesta específica de anticuerpos que protegen al vacunado frente a futuras infecciones.

El rotavirus reasortado demuestra una mejor respuesta inmunitante y mayor eficacia protectora que los rotavirus animales. Una vacuna cuatrivalente obtenida por este método fue comercializada en 1999 en los EE.UU., pero poco después fue retirada del mercado ante la sospecha de que daba lugar a invaginación intestinal en algunos de los niños vacunados³⁷.

Atenuación molecular de virus mediante técnicas de recombinación genética

Mediante esta técnica se modifican o se separan genes del virus con el fin de lograr mutaciones estables que eliminen el riesgo de reversión a la patogenicidad del agente. Las modificaciones o deleciones deben ser lo suficientemente amplias como para que no sean posibles mutaciones que vuelvan virulento al virus.

Esta tecnología se ha aplicado para la obtención de variantes atenuadas de los virus del herpes simple, gripe y poliomielitis, aunque ninguna de ellas ha sido comercializada hasta el momento^{4,5}.

Atenuación molecular de bacterias mediante técnicas de recombinación genética

La atenuación de bacterias mediante ingeniería genética es más compleja que la de los virus, básicamente porque el genoma de las bacterias es 100 veces más grande que el de los virus.

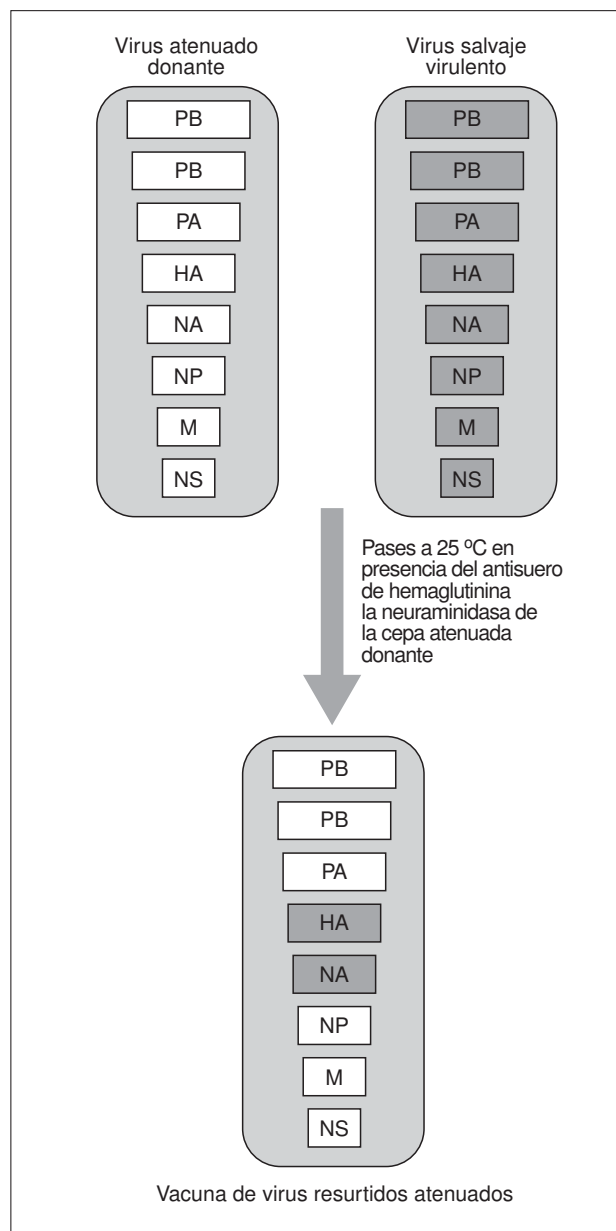


Fig. 1. Obtención de vacunas de la gripe resurtidas adaptadas al frío.

Las técnicas son similares a las utilizadas para la atenuación de virus. La estrategia se inicia con la identificación del gen responsable de la virulencia de las bacterias o de su habilidad para colonizar y sobrevivir en determinados tejidos del huésped. A continuación, mediante la tecnología de ADN recombinante ya descrita con anterioridad para los virus, se procede a eliminar el gen, lo cual es lo ideal, o a abolir o modular su expresión *in vivo*.

La primera vacuna anticolérica obtenida con esta tecnología ha sido la vacuna anticolérica oral CVD 103-HgR³⁸. Esta vacuna deriva de una de las cepas clásicas de *Vibrio cholerae*, la Inaba a la que se ha eliminado mediante la tecnología de ADN recombinante los genes que codifican la subunidad A de la toxina colérica, que es la responsable de la patogenicidad del germen, manteniendo los que codifican la subunidad B de la toxina colérica, que es la inmunógena. Esta vacuna ha sido comercializada en Suiza y en otros países.

Como la actual pandemia de cólera está causada por el biotipo El TOR, se ha desarrollado otra vacuna viva oral frente a la cepa Perr 15 y CVD-111 de este biotipo, con la misma tecnología de las derivadas del biotipo Inaba^{4,5}. También se están desarrollando con la misma tecnología vacunas vivas atenuadas frente al serogrupo 0139^{4,5}. Todas estas vacunas aún no han sido comercializadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salleras L. Concepto, clasificación y características generales de las vacunas. En: Salleras L, editor. Vacunaciones preventivas. Barcelona: Masson, 1998; p. 3-14.
2. Watson JC, Peter G. General immunizations practices. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines (3th ed.). Philadelphia: Saunders Company, 1999; p. 47-73.
3. Orenstein WA, Wharton M, Bart KJ, Hinman AR. Immunization. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases (5th ed.). Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2000; p. 3207-24.
4. Ellis R. New Technologies for making vaccines. En: Plotkin AS, Orenstein WA editors. Vaccines (3th ed.). Philadelphia: Saunders Company, 1999; p. 881-901.
5. Ellis R. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. Vaccine 2001;19:2681-7.
6. Salleras L. Pasado, presente y futuro de las vacunas. Vacunas 2001;2:101-9.
7. Ada GL. The traditional vaccines: an overview. En: Levine MM, Woodrow GL, Kaper JB, Cobon GS, editors. New generation vaccines (2nd ed.). New York: Marcel Dekker Inc, 1997; p. 13-53.
8. Rabinovich NR, McInnes P, Klein DL, Hall BF. Vaccine technologies: view to the future. Science 1994;265:1401-4.
9. Liu MA. Vaccine developments. Nature Medicine (vaccine supplement) 1998;4: S15-9.
10. Woodrow GC. An overview of biotechnology as applied to vaccine development. En: Levine MM, Woodrow GL, Kaper JB, Cobon GS, editors. New generation vaccines (2nd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., 1997; p. 25-34.
11. Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. Microbes Infect 1999;1:777-83.
12. Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. Vaccine 2001;19:2735-41.
13. Buttery JP, Maxon ER. Designing meningitis vaccines. JR College Physicians 2000;34:163-7.
14. Paoletti E. Applications of Pox virus vectors to vaccination: an up date. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:11349-53.
15. Imler JH. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. Vaccine 1995;13:1143-51.
16. Donnelly JJ, Ulmer AB, Liu MA. DNA vaccines. Life Sci 1997;60:163-72.
17. Donnelly JJ, Ulmer AB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. Ann Rev Immunol 1997;15:617-48.
18. Plotkin SA. Vaccination against the major infectious diseases. CR Acad Sci III 1999;322:943-51.
19. Plotkin SA. Immunological correlators of protection induced by vaccination. Ped Infect Dis J 2001;20:63-75.
20. Plotkin SL, Plotkin SA. A short history of vaccination. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines, (3th ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.
21. Clark HF, Glass RI, Offeit PA. Rotavirus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines (3rd ed.). Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 987-1005.
22. Sabin AB, Bohlger LR. History of Sabin attenuated poliovirus vaccine. J Biol Stand 1973;1:115-8.
23. Stores J, Weibel RE, Villarejos VM, Arguedas G, Buynak EB, Hilleman MR. Trivalent combined measles-mumps-rubella vaccine. Finding in clinical-laboratory studies. J Am Med Assoc 1971;218:355-71.
24. Radetsky M. Smallpox: a history of its rise and fall. Pediatr Infect Dis J 1999; 18:85-93.
25. Salleras L. Eliminación-erradicación de enfermedades infecciosas transmisibles prevenibles mediante vacunaciones. Vacunas 2000;1:151-2.
26. Connelly K, Starke JR. Bacille Calmette-Guerin Vaccine. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines (3rd ed.). Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 111-39.
27. Hackett J. Salmonella-based vaccines. Vaccine 1990;8:5-11.
28. Cryz SJ, Vamprapar N, Thisyakorn U, Olanratmanee T, Losonsky G, Levine MM, et al. Safety and Immunogenicity of *Salmonella* Typhi Ty21a vaccine in young Thai children. Infect Immun 1993;61:1149-51.
29. Murphy JR, Grez L, Schlesinger L, Ferreccio C, Baqar S, Muñoz C et al. Immunogenicity of *Salmonella* Tiph Ty21a. Vaccine for young children. Infection and Immunity 1991;59:4291-3.
30. Levine MM. Typhoid fever vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editores. Vaccines (3rd ed.). Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 781-814.
31. Levine MM, Ferreccio C, Cryz S, Ortiz E. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a Typhoid vaccine in randomised controlled field trial. Lancet 1990;II:891-4.
32. Black RE, Levine MM, Ferreccio C, Clements ML, Lanata C, Rooney, et al. Efficacy of one or two doses of Ty 21 a *Salmonella* Tiph vaccine in enteric coated capsules in a controlled field trial. Vaccine 1990;8:81-4.
33. Levine MM, Ferreccio C, Abrego P, Sanmartín O, Ortíz E, Cryz S. Duration of efficacy of Ty21a of *Salmonella* tiphy live oral vaccine. Vaccine 1999;17: S22-S7.
34. Treanor JJ, Kotloff K, Betts RF, Belshe R, Newman F, Iacuzio D, et al. Evaluation of trivalent, live, cold-adapted (CAIV-T) and inactivated (TIV) influenza vaccines prevention of virus infection and illness following challenge of adults with wild-type influenza A (H1N1), AH3N2 and B viruses. Vaccine 2000;18: 899-906.
35. McKay E, Higgins P, Tyrrell D, Pringle C. Immunogenicity and pathogenicity of temperature sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers. J Med Virol 1988;25:411-21.
36. Rennels MB, Glass RI, Dennelhy PH, Dernstein DI, Pichichero MB, Zito ET, et al. Safety and efficacy of high-dose Rhesus-human reassortant rotavirus vaccines - Report of the National multicenter trial. Pediatrics 1996;97:7-13.
37. CDC. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine United States 1998-1999. MMWR 1999;48:1483-91.
38. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Cryz SJ, Edelman R, Kaper JE, et al. Onset and duration of protective immunity in challenged volunteers after vaccination with live oral cholera vaccine. CVD 103-HgR. J Infect Dis 1992;166:837-41.