

LA BIOTECNOLOGÍA Y SU APLICACIÓN EN LAS CIENCIAS VETERINARIAS

Carlos G. Borroto

Subdirector del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana (Cuba)¹

Original: español

Resumen: *Mediante un cuestionario se obtuvo información y comentarios de los delegados de 21 de los 29 Países Miembros de la Comisión Regional de la OIE para las Américas, sobre aspectos relativos a la aplicación de la biotecnología a la salud animal, en especial en temas relacionados con la prevención, como el desarrollo y producción de fármacos y vacunas, el uso de modificadores metabólicos, probióticos y prebióticos, los métodos avanzados de diagnóstico veterinario, la inmunocastración y otras aplicaciones. También los aspectos regulatorios y de percepción pública.*

El informe analiza la situación en los países de la región en relación al estado del arte de estas tecnologías en el mundo, evidenciándose que las tecnologías derivadas de la biotecnología moderna ofrecen potencialidades muy importantes para la generación de vacunas, medicamentos y otros productos de uso veterinario.

El desarrollo y uso de estas tecnologías esta concentrada en una parte de los países de la región, mientras otros aún no la utilizan lo suficiente. Existe pues la necesidad de capacitación y divulgación de estas tecnologías para lo cual hay condiciones adecuadas de desarrollo en varios países del área. Es necesario también propiciar el establecimiento de un marco regulatorio eficaz y comprensivo para el uso seguro de estas tecnologías tanto desde el punto de vista de bioseguridad, como el de las regulaciones establecidas en el registro veterinario. Todos los países del área consideran importante el papel de la OIE en el establecimiento de normas adicionales para los productos veterinarios producidos mediante las herramientas de la biotecnología moderna.

Palabras clave: biotecnología – ciencia veterinaria – Américas

¹ Dr. Carlos G. Borroto Nordelo, Sub-Director, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Av. 31 % 158 y 190, Rpto. Cubanacán, Playa, Marianao, La Habana (Cuba)

Introducción

En la 73ª Sesión General de la OIE en mayo del 2005 se presentó y analizó el tema de “Aplicaciones de la biotecnología para el ganado y los productos zoonosarios” bajo el precepto que la biotecnología agrícola moderna, en lo concerniente a la salud y producción de animales, es una mezcla fascinante de ciencia de los animales, medicina veterinaria y biología molecular.

En aquella oportunidad se hizo énfasis en temas tan importantes como las regulaciones y la percepción pública de la aplicación de la biotecnología en la sanidad y producción animal en especial en temas tan polémicos como la transgénesis animal, la clonación, el xenotrasplante, etc.

Tanto los resultados del cuestionario circulado al efecto, como la presentación técnica, brindaron importantes resultados de suma utilidad para la labor de la OIE y los Países Miembros.

En esta oportunidad para la Conferencia de la Comisión Regional de la OIE para las Américas se ha concebido la presentación y análisis de la aplicación de la biotecnología a la salud animal, en especial en temas relacionados con la prevención, como el desarrollo y producción de fármacos y vacunas, la estimulación del sistema inmune en animales de granja y organismos acuáticos (incluyendo modificadores metabólicos, prebióticos y probióticos), los métodos avanzados de diagnóstico veterinario, la inmunocastración, etc. Son abordados así mismos los aspectos regulatorios y de percepción pública.

Con el objetivo de obtener información de los Países Miembros sobre este tema técnico, se circuló un cuestionario sobre los puntos principales a abordar en el mismo.

Enviaron respuesta 21 Países Miembros (Argentina, Barbados, Belice, Brasil, Canadá, Colombia, Cuba, Chile, Ecuador, El Salvador, Estados Unidos de América, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, México, Panamá, Paraguay, República Dominicana, Trinidad y Tobago y Uruguay).

No es posible en un informe resumen como este recoger el universo completo de las potenciales aplicaciones de la biotecnología en las ciencias veterinarias. Es por eso que hemos seleccionado un conjunto de tecnologías de impacto real o potencial reconocido internacionalmente y que deberían promoverse y regular su uso en la Región.

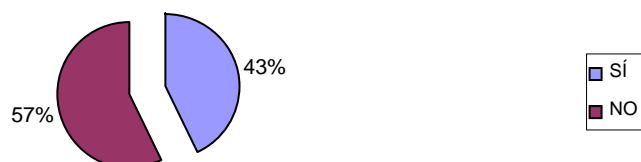
El informe se ha estructurado de modo que recoja el estado del arte y la aplicación de estas principales aplicaciones de la biotecnología moderna en las ciencias veterinarias, en relación al estadio en que se encuentra la región según las respuestas recibidas, que se abordan en las ocho secciones siguientes:

1. Investigación,
2. Vacunas veterinarias obtenidas por biotecnología,
3. Inmunocastración,
4. Estimulación del crecimiento y/o del sistema inmune,
5. Sistemas de diagnóstico veterinario,
6. Prebióticos y probióticos,
7. Carencias más importantes de aplicaciones biotecnológicas en las ciencias veterinarias en cada uno de los países,
8. Marco regulatorio.

1. Investigación

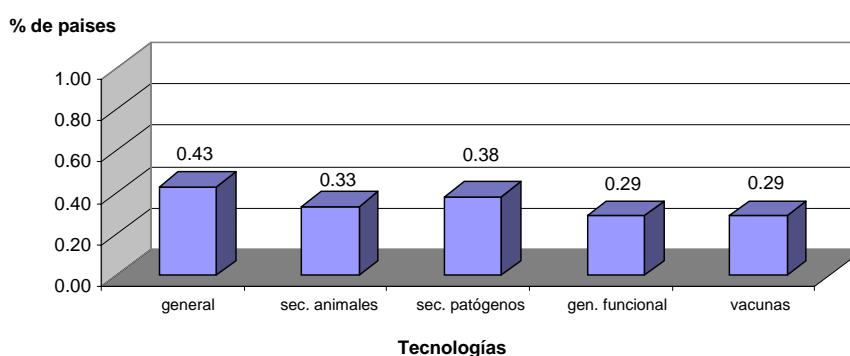
En la región existen países con un alto grado de desarrollo en las investigaciones en este campo, concentrándose principalmente en Argentina, Brasil, Canada, Chile, Colombia, Cuba, Estados Unidos de América, México y Uruguay, que representan el 43% de los países que contestaron el cuestionario (ver [Figura 1](#)).

Figura 1.- ¿Se están llevando a cabo en su país investigaciones sobre los animales y los productos, incluidos las vacunas y los medicamentos, obtenidos por biotecnología?



Existe incluso en varios de estos países desarrollo en temáticas avanzadas relacionadas con la genómica, proteómica y bioinformática aplicadas a las ciencias veterinarias (ver [Figura 2](#)).

Figura 2.- ¿Se están llevando a cabo en su país investigaciones sobre genómica animal (incluye genómica funcional, proteómica, bioinformática)?



Si bien es cierto que la no existencia de actividades importantes de investigación en este campo en más de la mitad de los países de la región es un factor no favorable, la existencia de estos polos de desarrollo científico en este esfera, abre una posibilidad real de capacitación, transferencia tecnológica y apoyo al desarrollo de infraestructura y proyectos específicos dentro del área.

2. Vacunas veterinarias obtenidas por biotecnología

Está ampliamente demostrado que la vacunación es el mejor método disponible para prevenir con un buen comportamiento costo-beneficio las pérdidas económicas en los animales. Sin embargo continuamos sufriendo de graves enfermedades en varias regiones del mundo incluyendo la nuestra.

Ocho de las principales diez causas de muerte en humanos es por enfermedades infecciosas. En animales, con un ciclo de vida más corto, la situación es aún peor.

Las vacunas convencionales se aplican ya por más de dos siglos. Las mismas se seguirán utilizando en la misma medida que sean las más efectivas disponibles en cada caso y se seguirán desarrollando las mismas en los casos que corresponda.

Sin embargo, para disminuir el riesgo de reversión a la virulencia de las vacunas vivas, la interferencia con anticuerpos resultantes de la inmunización pasiva, evitar la contaminación con otros virus, disminuir las afectaciones durante el almacenaje y otros aspectos, ya están en uso varias vacunas basadas en técnicas biotecnológicas y muchas más están en diferentes estadios de desarrollo [1, 6, 13].

Estas vacunas brindan la gran ventaja además de posibilitar el uso de sistemas de diagnóstico diferencial (DIVA), que permita identificar separadamente los animales enfermos de los vacunados [5].

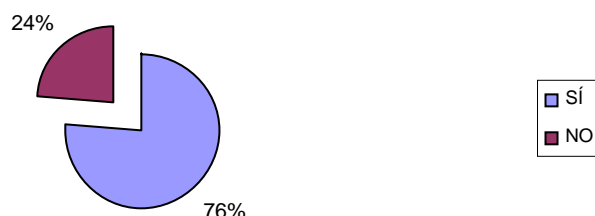
Estas vacunas llamadas vacunas DIVA por su acrónimo en inglés (*Differentiate Infected from Vaccinated Animals*), permiten diferenciar los animales vacunados de los expuestos a las razas del virus, posibilitando la erradicación de enfermedades de un país de una forma más rápida y económica, que cuando se utilizan

los métodos convencionales de erradicación. La erradicación de la enfermedad de Aujeszky, fue de las primeras que utilizó con éxito la estrategia DIVA.

Las vacunas veterinarias de base biotecnológica no están siendo utilizadas sólo para el control de enfermedades infecciosas, sino también para el incremento de la productividad modulando hormonas o elementos del sistema inmune, para la inmunocastración, el control de ectoparásitos, etc.

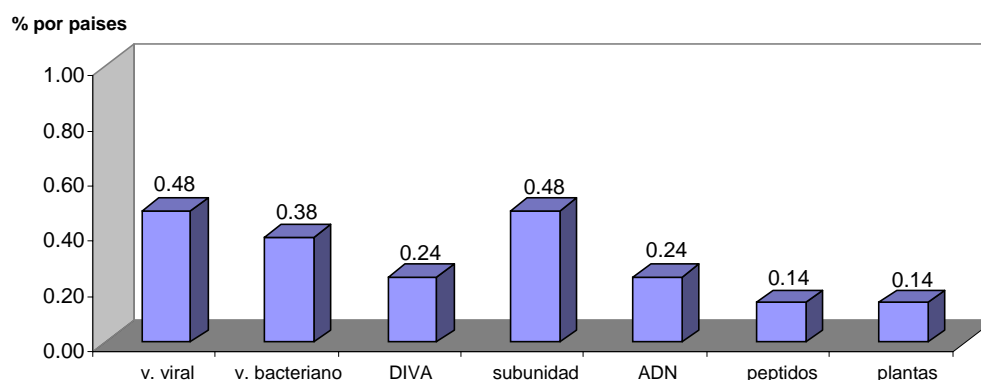
El 76% de los países de la encuesta, producen o aplican alguna vacuna obtenida por vías biotecnológicas, lo cual es un avance notable en la introducción de esas tecnologías (Figura 3).

Figura 3.– ¿Se produce o aplica alguna vacuna animal en su país que sea obtenida por biotecnología?



Entre las tecnologías utilizadas, lamentablemente sólo una cuarta parte de los países utilizan al menos una de las vacunas marcadas que permiten el diagnóstico diferencial (Figura 4).

Figura 4.– Tipos de vacunas



Un aspecto importante en estas nuevas tecnologías es su uso seguro y la adecuada información al público de su naturaleza, cuales son sus beneficios, como es el escrutinio regulatorio de cada una y como se manejan las mismas para reducir al mínimo sus riesgos potenciales.

Un inadecuado manejo de la información al público en general y a los decisores políticos, puede conducir al fracaso o la prohibición de un producto demostradamente seguro y eficaz.

En la Figura 5 se puede observar la insuficiente información en dos terceras partes de los países de la región y en la Figura 6 podemos constatar que sólo en una cuarta parte de los países el público está informado y los considera seguro.

Éste es un tema que debemos prestarle la debida atención si queremos abrazar las ventajas poderosas de estas tecnologías sobre bases regulatorias seguras.

Figura 5.– ¿El público en general está informado de que en su país se utilizan vacunas o medicamentos obtenidos por biotecnología?

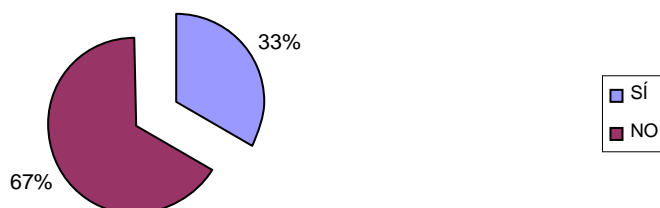
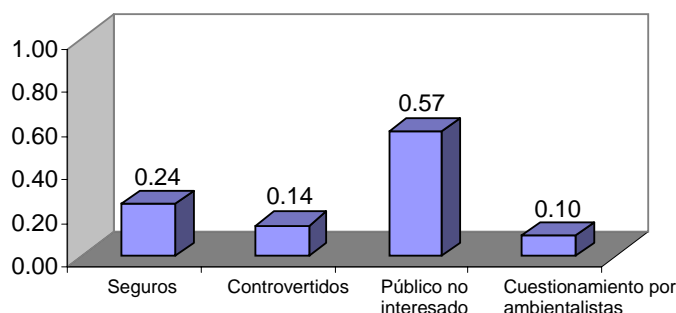


Figura 6.- ¿Cómo percibe generalmente el público de su país las vacunas y/o los medicamentos obtenidos por biotecnología?



3. Inmunocastración

En animales de importancia económica (porcino, bovino) y afectivos (perros, gatos), es frecuente la conveniencia de prevenir la reproducción.

Los métodos más usados son la castración quirúrgica y la administración de esteroides. Ambos métodos tienen inconvenientes, el primero requiere de personal especializado para llevarse a cabo, es irreversible, provoca infecciones, así como posterior desarrollo de hernias inguinales e inmunosupresión, llegando a provocar muertes. El segundo causa efectos secundarios que afectan la salud de los animales.

Por estas razones se ha ensayado la inmunocastración de animales con el uso de péptidos análogos a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) conjugados con proteínas, con el objetivo de levantar anticuerpos que neutralicen la función de la GnRH [11].

La inmunocastración está reportada como alternativa ventajosa en los animales de importancia económica, por mejorar el comportamiento agresivo de los machos, el olor y sabor de la carne, la conversión alimenticia, producirse canales más magras y una reducción en el consumo de alimento.

Para el caso de los animales afectivos la característica reversible de la inmunocastración es una ventaja que marca la diferencia con las otras alternativas.

En la región, esta tecnología se aplica en menos de la mitad de los países, y sólo en el 18% de los mismos, el público está informado sobre sus potencialidades, su uso y las regulaciones que garanticen el uso seguro de esta tecnología.

Es de destacar que sólo en el 10% de los países se considera controvertida esta tecnología.

4. Estimulación del crecimiento y/o del sistema inmune

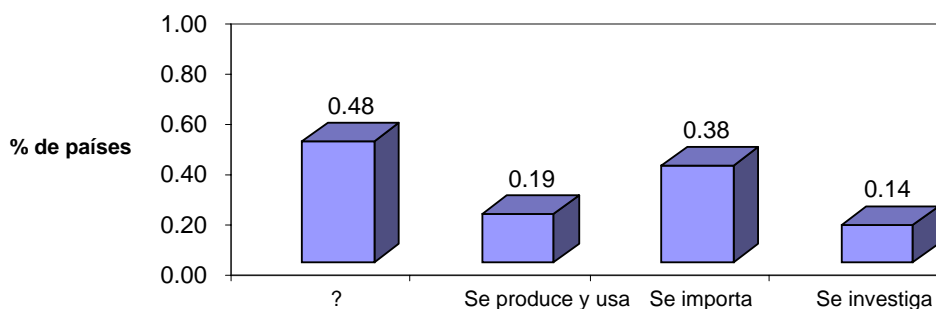
En los últimos años se han desarrollado biomoléculas que han probado su acción de encender genes endógenos que conducen a un incremento del crecimiento y activación del sistema inmune (innato y adquirido).

Este accionamiento de diferentes vías metabólicas además de favorecer un mayor crecimiento y desarrollo de las crías jóvenes, provoca una mayor supervivencia, ganancia de peso y una sincronización de la población de animales.

En particular en los organismos acuáticos (peces y camarones) se han ensayado con éxito estos "modificadores metabólicos" que mejoran significativamente la producción y reducen el uso de antibióticos y de químicos [7].

Aunque es una aplicación relativamente reciente, ya el 48% de los países de la región utilizan o investigan sobre los mismos (Figura 7).

Figura 7.– ¿Se produce, aplica o investiga en su país algún estimulador del crecimiento o sistema inmune en animales (incluidos los organismos acuáticos)?



5. Sistemas de diagnóstico veterinario

La detección e identificación de enfermedades y el diagnóstico de sus agentes causales se han realizado por numerosos métodos, desde los más clásicos utilizando técnicas morfológicas y bioquímicas, hasta utilizando cada vez más las técnicas inmunológicas y moleculares de la biotecnología moderna.

Estas técnicas inmuno enzimáticas se mejoran continuamente y se incorporan tecnologías como las tiras rápidas diagnósticas de muy fácil uso, incluso a nivel de unidad productiva y con una respuesta inmediata.

Por otra parte, con el desarrollo de la biología molecular, se han abierto posibilidades muy importantes en las técnicas de diagnóstico y se generalizan aceleradamente en los laboratorios de diagnóstico veterinario [9].

Las secuencias únicas de DNA proveen un alto grado de especificidad en el diagnóstico y el control de especies de microorganismos patógenos y sus razas y las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten niveles de especificidad extremadamente altos [4].

Los métodos moleculares no sólo han incrementado la sensibilidad y la especificidad de los métodos de diagnóstico, sino que han reducido mucho la subjetividad inherente a la interpretación de los datos morfológicos y biológicos.

El PCR a tiempo real (RT-PCR) es una de las últimas mejoras a las técnicas de PCR que han sido incorporadas a los laboratorios de diagnóstico veterinario. El procedimiento se desarrolla todo en un tubo individual sellado, que disminuye muchísimo el problema de la contaminación cruzada, y el procesamiento electrónico en directo de la fluorescencia detectada, elimina la necesidad de la reacción posterior y la corrida electroforética necesaria en el PCR tradicional.

El RT-PCR permite además la aplicación de métodos cuantitativos.

La secuenciación de genomas completos de patógenos brinda importantes elementos para los estudios de la biología y para mejorar el diagnóstico y control de parásitos.

Las nuevas técnicas de las micromatrices (*microarrays*) permiten el tamizaje (*screening*) para los genotipos de parásitos específicos y constituyen un apoyo importante para los estudios epidemiológicos de parásitos veterinarios.

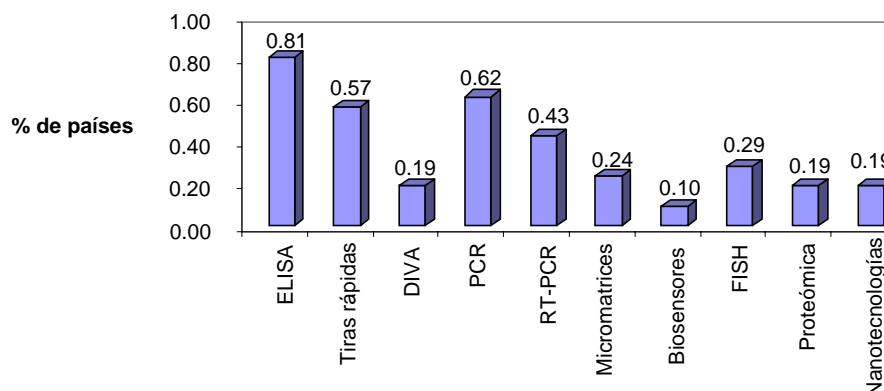
Las herramientas de la proteómica permiten la identificación y caracterización de las proteínas producidas por los patógenos y tienen gran aplicación en el diagnóstico veterinario al brindar la posibilidad de estudiar el patrón de expresión de proteínas de virus, bacterias y otros agentes patógenos. Permite además estudiar las proteínas que se expresan o reprimen diferencialmente como resultado del ataque de patógenos, lo cual es de suma importancia para identificar nuevos métodos de control de los mismos, ya sea por vacunas, fármacos, etc.

Otras tecnologías como los biosensores, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y las nanotecnologías se incorporan como herramientas al diagnóstico veterinario.

En las respuestas a la encuesta se evidencia que en el 80% de los países de la región se produce o investiga en sistemas de diagnóstico veterinario.

Sin embargo, como puede observarse en la [Figura 8](#), es bajo el por ciento de países que reportan la utilización de tecnologías modernas de la biología molecular en el diagnóstico veterinario, incluidas las que se consideran ya de rutina, como el PCR y el RT-PCR.

Figura 8.– Tecnologías de diagnóstico utilizadas en el país



6. Probióticos y prebióticos

Los **probióticos** se definen como cultivos de microorganismos vivos que se establecen en el tracto intestinal de humanos y/o animales y ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del hospedero. Los géneros de bacterias probióticas más importantes son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. También existen levaduras que ejercen efecto probiótico.

Los **prebióticos** son ingredientes alimenticios que mejoran la salud del consumidor al estimular de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de las bacterias probióticas en el tracto intestinal. Los principales prebióticos son oligosacáridos no digeribles, tales como: fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), maltooligosacáridos (MOS) y xilooligosacáridos (XOS). Los FOS y la inulina son considerados los prebióticos típicos y se comercializan ampliamente para uso en humanos y animales monogástricos.

Los **simbióticos** son una mezcla de probióticos y prebióticos que afectan benéficamente la salud del consumidor mejorando la supervivencia e implantación de los primeros en el tracto gastrointestinal por medio de una estimulación selectiva de su actividad y/o crecimiento.

Está documentado en la literatura científica que el consumo de probióticos, prebióticos o simbióticos mejora la flora intestinal, previene y rehabilita enfermedades diarreicas, mejora la composición de lípidos de la sangre, reduce colesterol y mejora presión sanguínea, incrementa la absorción y retención de calcio, modula funciones inmunes y disminuye el riesgo del cáncer del colon [3, 10, 12].

En animales de cría, el empleo de probióticos, prebióticos o simbióticos ofrece el beneficio adicional de reducir o eliminar el uso profiláctico de antibióticos en los piensos o agua.

El uso de los probióticos en la acuicultura es amplio, utilizándose con varios objetivos:

- Exclusión competitiva de patógenos,
- Fuente de nutrientes y contribución enzimática a la digestión,
- Mejorador de la calidad del agua,
- Estimulador de la respuesta inmune,
- Efectos antivirales.

Se ha convertido por ello en una herramienta de manejo importante, pero su eficiencia depende de la comprensión de la competencia entre las cepas utilizadas [2].

En dos terceras partes de los países de la región se utiliza este tipo de productos, fundamentalmente en bovinos, cerdos y aves y debe promoverse su incremento en el resto (Figuras 9 y 10).

Figura 9.

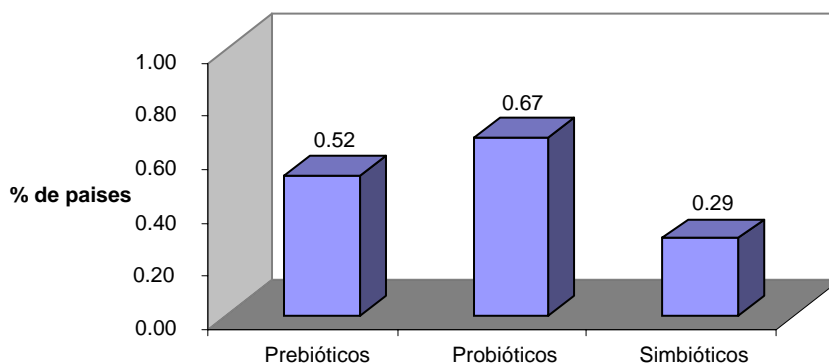
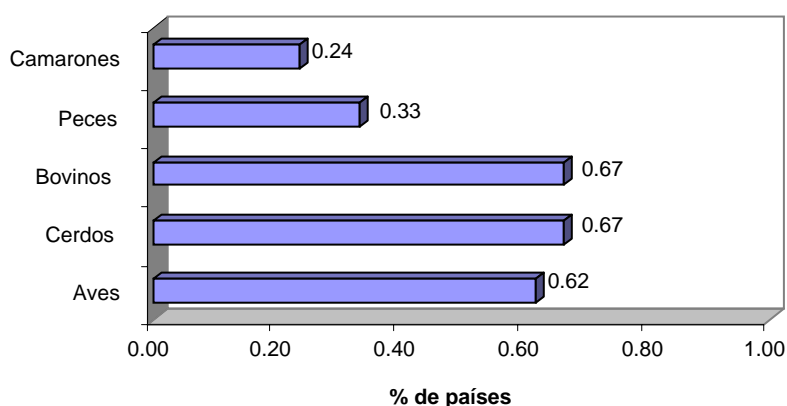


Figura 10.- Especies



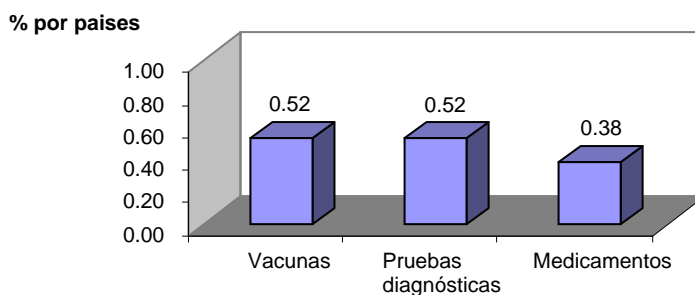
7. Carencias más importantes de aplicaciones biotecnológicas en las ciencias veterinarias en cada uno de los países

Tres cuartas partes de las autoridades veterinarias de los países, manifestaron tener necesidad de nuevos y más eficaces aplicaciones veterinarias mediante el uso de la biotecnología (Figura 11).

Es interesante señalar que el 100% de los países con más aplicaciones veterinarias de base biotecnológica, manifestaron esa necesidad de nuevos productos y que todos los que no contestaron afirmativamente, tienen muy pocas aplicaciones de este tipo en uso en su país.

Esto hace evidente el hecho que mientras más se conocen, ensayan y evalúan estas tecnologías, más posibilidades se le encuentran, lo que conlleva a la necesidad de una divulgación y capacitación de los especialistas de la región en esta temática.

Figura 11.- ¿Qué carencias tiene su país en cuanto a productos biológicos producidos con biotecnologías modernas para mejorar el control de las enfermedades de los animales?



8. Marco regulatorio

En las secciones anteriores han quedado claras las altas potencialidades que la biotecnología moderna proporciona a las ciencias veterinarias y hemos evaluado el estado de la aplicación de esas tecnologías en los países de la región.

No obstante, estas tecnologías requieren un marco regulatorio adecuado que garanticen el uso seguro de las mismas.

En el caso de las tecnologías que impliquen la liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados, adicionalmente a las pruebas necesarias para el registro de un producto veterinario (por ej. pureza, seguridad, potencia, eficacia), es necesario realizar una evaluación de riesgo particular que demuestre que el producto es inocuo para la salud humana y animal y compatible con el ambiente.

Por otra parte, el desconocimiento o falta de regulaciones específicas, provoca que en muchas ocasiones se considere erróneamente que todas las aplicaciones de la biotecnología moderna, constituyen organismos genéticamente modificados (OGM) y en una gran parte de los casos no es así. Por ejemplo son muchos, desde las vacunas por subunidad que contienen sólo proteínas como ingrediente farmacéutico activo, o modificadores metabólicos conteniendo sólo proteínas o partes de ellas (polipéptidos), prebióticos o probióticos, o sistemas de diagnósticos específicos, etc.

De hecho, la mayoría de las aplicaciones a que hemos hecho referencia en este informe, no implican la liberación al ambiente de OGM.

Cuando son OGM realmente, deben ajustarse a dos tipos de regulaciones, uno el que se establece a todos los productos de uso veterinario y el otro a las regulaciones específicas de bioseguridad.

Cuando las técnicas de ingeniería genética se utilizan durante el proceso de producción pero no están contenidas en el producto final, entonces las regulaciones de bioseguridad son aplicables a los lugares de fabricación y no a los de uso final.

El desarrollo impetuoso de estas tecnologías exige el desarrollo rápido y eficiente de regulaciones específicas para su uso, pues complica el asunto el hecho de la existencia de cientos de compañías tratando de obtener beneficios económicos de las mismas y por tanto presionando para su introducción.

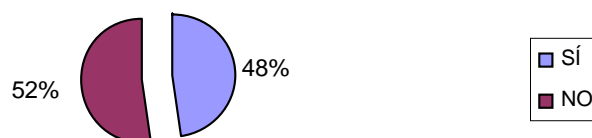
En la región mucho se ha avanzado en las regulaciones para el registro y control de los productos veterinarios de modo que tengan la calidad adecuada y la pureza, eficacia y seguridad de los productos y para asegurar que los animales tratados no sean dañinos para los consumidores.

Además de las regulaciones establecidas por las autoridades nacionales, a nivel regional es encomiable la labor para la armonización que lleva a cabo el Comité de las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET) basificado en la oficina regional de la OIE [8].

El resultado de la encuesta corrobora lo analizado en CAMEVET sobre la necesidad de avanzar en el marco regulatorio de los productos veterinarios producidos por las tecnologías de la biotecnología moderna.

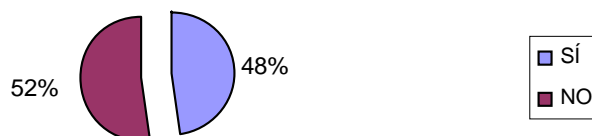
En menos de la mitad de los países de la región que respondieron la encuesta existen regulaciones de bioseguridad para el uso de estas tecnologías (Figura 12).

Figura 12.– ¿Existen regulaciones de bioseguridad con respecto a vacunas de uso veterinario obtenidas por biotecnología?



Y lo que no es menos preocupante, en menos de la mitad de los países existen requisitos especiales para el registro de medicamentos veterinarios de base biotecnológica (Figura 13).

Figura 13.– ¿Existen requisitos especiales para el registro de estas vacunas en el Registro de Medicamentos Veterinarios?



Es evidente la necesidad urgente de apoyar a los países de la región en la implementación de un marco regulatorio adecuado para el uso seguro de estas tecnologías, tanto desde el punto de vista de la bioseguridad como en el de los registros de productos veterinarios.

Por eso no es de extrañar que la única pregunta de la encuesta, que tuvo respuesta unánime y positiva, fuera la del interés de los países de la región que la OIE produzca más normas en el campo de productos veterinarios producidos con biotecnología moderna.

Conclusiones

1. Las tecnologías derivadas de la biotecnología moderna ofrecen potencialidades muy importantes para la generación de vacunas, medicamentos y otros productos de uso veterinario.
2. El desarrollo y uso de estas tecnologías esta concentrada en una parte de los países de la región, mientras otros aún no la utilizan generalizadamente.
3. Existe la necesidad de capacitación y divulgación de estas tecnologías para lo cual hay un marco propicio de desarrollo en varios países del área.
4. Es necesario propiciar el establecimiento de un marco regulatorio eficaz y comprensivo para el uso seguro de estas tecnologías tanto desde el punto de vista de bioseguridad como el de las regulaciones establecidas en el registro veterinario. Los países miembros consideran necesario que la OIE produzca más normas en este campo.

Referencias

- [1] Babiuk L.A.– Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. *The Veterinary Journal* 2002;164:188-201.
- [2] Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J.L.– The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 2006;114:173-86.
- [3] Banguela A., Hernandez L.– Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotecnología Aplicada* 2006;23(3).
- [4] Zarlenga D.S., Higgins J.– PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 2001; 101:215-30.
- [5] Henderson L.M.– Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals* 2005;33:203-9.
- [6] Shams H.– Recent developments in veterinary vaccinology. *The Veterinary Journal* 2005;170:289-99.
- [7] Martínez R., Carpio Y., Gómez Y. et al.– Acuabio 1 estimula el metabolismo anaerobio y el sistema inmune innato de las larvas de goldfish y tilapia. *Biotecnología Aplicada* 2006;23:289-95.
- [8] Minassian M.S.– Legislation requirements for control over veterinary products in South America. 2008 p. 1-10.
- [9] Schmitt B., Henderson L.– Diagnostic tools for animal diseases. *Rev sci tech Off int Epiz*, 2005;24(1):243-50.
- [10] Schrezenmeir J., de Vrese M.– Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):361S-4S.
- [11] Thompson D.L.– Immunization against GnRH in male species /comparative aspects/. *Animal Reproduction Science* 2000;60-61:459-69.
- [12] Tomasiak P.J., Tomasiak P.– Probiotics and prebiotics. *Cereal Chem* 2003;80(2):113-7.
- [13] Vercruyse J., Knox D.P., Schettters T.P., Willadsen P.– Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *TRENDS in Parasitology* 2004;20(10):488-92.