

**PRUEBA DE ESTABLO PARA EVALUAR LA  
EFECTIVIDAD DE LA VACUNA  
TICK-VAC® CONTRA LA GARRAPATA  
DEL GANADO**

*Boophilus microplus*

Informe Final

Colombia

**Investigadores**

JESUS ANTONIO BETANCOURT ECHEVERRY M.V.Z.; M.Sc.; Ph. D. Asesor en  
Parasitología Veterinaria

**Año**

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>4</b>
<b>3. Metodología</b>	<b>5</b>
<b>4. Resumen de Parámetros</b>	<b>10</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>12</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>28</b>
<b>7. Agradecimientos</b>	<b>30</b>
<b>8. Investigadores Responsables</b>	<b>31</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>32</b>

# 1. Introducción

En Colombia, el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus*, ampliamente distribuida en todos los climas medios y cálidos del país, se ha basado principalmente en el empleo continuado de compuestos químicos acaricidas. Este enfoque ha resultado no sólo costoso, sino que ha favorecido la presentación de resistencia contra este parásito por parte de los diferentes grupos de compuestos químicos presentes en el mercado (organofosforados, piretroides, carbamatos, formamidinas, etc.).

Adicionalmente, tal estrategia propicia la contaminación del ambiente y la presencia de residuos de compuestos químicos en productos y subproductos de origen animal con destino a la alimentación humana. Sobre este último punto y sobre sus implicaciones en los mercados internacionales ya se ha formulado la alerta correspondiente (Thulner, 1997).

Como alternativa, desde hace varias décadas se han propuesto esquemas de manejo integrado del problema, combinando el uso reducido de compuestos químicos con herramientas como: razas resistentes, remoción de animales susceptibles, especies de animales desfavorables, pastos desfavorables, descanso de potreros, extractos de plantas, hongos y, últimamente, vacunas (Walker y col., 1988; Oliveros y col., 1996; Betancourt, 1996, 2001; Benavides y col., 2001; Cassalett, 2001; FAO, 2003; Portela y col., 2003).

En Australia se desarrolló una vacuna a partir de una proteína (Bm86) del intestino de la garrapata *B. microplus*, recombinada en *Escherichia coli*. La vacuna es aplicada en ese país para el control de *B. microplus*, habiéndose liberado las versiones comerciales *TICK GARD®* y *TICK GARD PLUS®* (Willadsen y col., 1995; Willadsen, 1997).

Posteriormente, investigadores cubanos (Rodríguez y col., 1995) desarrollaron una vacuna contra el mismo parásito, basada en la misma tecnología, pero empleando para la recombinación la levadura *Pichia pastoris*. Esta vacuna fue introducida al mercado colombiano hace casi una década con el nombre de *GAVAC®*; sin embargo, debido principalmente a que no se educó en forma adecuada al ganadero sobre el modo de acción de la misma, no tuvo el éxito comercial esperado.

LIMOR DE COLOMBIA S.A., con base en investigaciones preliminares del Dr. Federico Patiño en la Universidad de Caldas, ha venido desarrollando desde hace más de 15 años una vacuna (*TICK-VAC®*) contra *B. microplus*, consistente en una mezcla de proteínas de larvas del parásito, inactivadas y posteriormente vehiculizadas en un adyuvante oleoso.

Observaciones de campo adelantadas en más de 6000 bovinos en cuatro regiones de Colombia, así como pruebas en confinamiento ejecutadas por el Dr. Patiño en la Universidad de Caldas (véase Pareja y Gómez, 2004), indican que el inmunógeno ejerce reducción en el número, peso y capacidad reproductiva de las garrapatas que tratan de completar su ciclo

en los bovinos inoculados con el mismo.

El producto se encuentra actualmente en trámite de registro ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

En atención a una solicitud de la Oficina de Control de Insumos Pecuarios del ICA, ante la cual LIMOR DE COLOMBIA ha tramitado la expedición de la licencia de registro del producto, se llevó a cabo la prueba crítica controlada en terneros estabulados, de la cual trata el presente protocolo.

## 2. Objetivos

### General

Evaluar el efecto de la vacuna *TICK-VAC*® sobre infestaciones con la garrapata *B. microplus* en terneros estabulados.

### Específicos

- Evaluar el efecto de la vacuna sobre el número, peso y capacidad reproductiva (medida en términos de oviposición y fertilidad) de garrapatas *B. microplus*, tanto en animales vacunados como en controles sin vacunar, infestados artificialmente con larvas del parásito.
- Determinar los niveles de anticuerpos producidos contra *B. microplus* en los animales vacunados y no vacunados, y establecer la relación de dichos niveles con el grado de protección observado.

### 3. Metodología

#### Cepa de garrapata a emplear

Para el estudio se empleó la Cepa de Producción de *B. microplus* que posee LIMOR DE COLOMBIA, la cual fue originalmente obtenida en la vereda Aguadita, Fresno (Tolima), y es mantenida en las instalaciones que para tal fin posee el laboratorio productor en Villa de Leyva.

#### Animales experimentales

Para el estudio se emplearon once bovinos machos y una hembra, mestizos de Holstein X Normando, de cuatro a seis meses de edad, obtenidos en una zona en la cual no habían tenido oportunidad de exponerse a la garrapata *B. microplus*.

Los terneros fueron identificados y luego alojados en compartimientos individuales con piso enrejado, para permitir el paso y posterior recolección de las teleoginas que se desprendieron de cada uno de ellos.

Durante el estudio, los terneros recibieron pasto de corte fresco picado (10 kg/animal/día) y concentrado comercial (1 kg/animal/día), sal mineralizada al 8 % (50 g/animal/día) y agua a voluntad.

A su llegada a las instalaciones, todos los terneros fueron pesados y vermifugados con Fenbendazol (*PANACUR*®) a la dosis de 5 mg/kg de peso vivo.

#### Localización

La prueba de establo propiamente dicha se realizó en las instalaciones especiales que, para este tipo de ensayos, posee CORPOICA en el Centro de Investigación Palmira.

Los exámenes serológicos para determinación de anticuerpos se realizaron en el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Javeriana en Bogotá.

#### Prueba de establo

Pasados siete días de su ingreso a los compartimientos individuales (período de adaptación), los 12 bovinos fueron asignados a dos grupos (1 y 2) de seis animales cada uno, procurando que en cada grupo quedaran representados animales de diferente peso. Este momento fue considerado como el día cero (0) del estudio.

En este día, y en los días 20 y 60 de la prueba, cada uno de los animales del grupo 1 (control sin vacunación) fue inyectado, vía intramuscular, con dos mililitros de emulsión

oleosa sin antígeno, y cada animal del grupo 2 (vacunados) recibió dos mililitros de vacuna *TICK-VAC*®.

En tres de los bovinos vacunados se empleó la vía intramuscular y en los tres restantes se utilizó la vía subcutánea. Esta etapa de la prueba se denominó *Fase de Inmunización*.

En cada uno de los días 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77 y 80 del estudio, cada uno de los terneros (controles y vacunados) fue infestado, con ayuda de un pincel No. 3, con aproximadamente 2000 larvas (resultantes de la incubación de 0.1 gramo de huevos) de *B. microplus* de 11 a 21 días de edad. Este período se denominó *Fase de Desafío*.

Diariamente, a partir del día 71 del estudio (día 19 post-infestación), se colectaron, entre las 09:00 y las 10:00 horas, todas las teleoginas que cayeron de cada uno de los 12 terneros de la prueba.

Las teleoginas producidas por cada ternero fueron lavadas, contadas y luego pesadas en una balanza electrónica. Del producido de cada ternero se tomó una muestra de 50 teleoginas (o un número menor si el ternero no produjo las 50), las cuales fueron pesadas e incubadas a 28 °C de temperatura y 75 % de humedad relativa por un período de 12 a 14 días para permitir la oviposición.

Transcurrido este período, se registró el peso de los huevos producidos por cada muestra de 50 (o menos) teleoginas. Una muestra de un (1) gramo (o la cantidad disponible) de huevos fue depositada en un tubo de vidrio de fondo plano de cinco cm de alto por 2.5 cm de diámetro, el cual fue luego sellado con un tapón de algodón recubierto de gasa.

Los tubos con huevos fueron llevados nuevamente a incubación en las condiciones descritas por 30 días para garantizar la eclosión.

Para determinar el Porcentaje de Eclosión se tomó una muestra del material incubado, con ayuda de una espátula metálica, y se examinó bajo el microscopio estereoscópico, contando huevos infértiles y cascarones (dejados por las larvas que emergieron). Con estos datos se calculó el Porcentaje de Eclosión empleando la fórmula que se describe más adelante con los demás parámetros.

Diariamente, durante todo el estudio, hacia las 08:00 horas, se tomó temperatura rectal a cada uno de los terneros de la prueba para detectar oportunamente, y previo examen de extendido sanguíneo coloreado, cualquier episodio clínico por hemoparásitos.

Cuando éstos se presentaron, los terneros comprometidos fueron tratados con la terapia específica (oxitetraciclina, diaceturato de 4,4-diazaminobenzamidina, Ringer lactato, antiipréticos, etc.).

A todos los terneros se les tomó sangre de la vena yugular, en tubos vacutainer estériles sin anticoagulante, en los días 0, 30, 60, 90, 120 y 150 del estudio.

El suero obtenido de cada muestra fue envasado en viales Eppendorf de plástico debida-

mente rotulados y remitidos, bajo condiciones de refrigeración, al Laboratorio de Inmunología de la Universidad Javeriana para determinación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA.

Cada 15 días se registró el peso de los animales y se tomó sangre con anticoagulante para determinar el valor del hematocrito.

## Medición de parámetros

Los parámetros que han sido comúnmente empleados para estudiar la fase parasítica del ciclo evolutivo de *B. microplus*, bajo diferentes circunstancias, se basan, en términos generales, en los trabajos publicados por Drummond y col. (1971, 1973).

Esta metodología permite estimar la calidad de las teleoginas producidas (medida en términos de peso) y la capacidad reproductiva de las mismas, calculada a partir del peso de los huevos producidos y el porcentaje de ellos que eclosionan.

Con esta información se construyen datos como: Índice de Eficiencia de la Conversión (IEC), Índice Reproductivo (IR) y Porcentaje de Control de la Eficiencia Reproductiva (PCO-NER), frecuentemente observados en diversas publicaciones.

En varios trabajos se pueden observar estos mismos parámetros o índices con diferentes nombres.

Con el tiempo se han introducido, especialmente para pruebas de campo y de establo con compuestos acaricidas, otros parámetros, incluyendo número de garrapatas que sobreviven en terneros tratados y no tratados.

Tradicionalmente se han empleado fórmulas como la de Roulston y col. (1968). Recientemente, Kemp y col. (2003) incluyeron algunas modificaciones consistentes en la aplicación de un factor de corrección a los recuentos observados en el grupo control (ADEQ).

Para el presente trabajo, dado que no se trataba de evaluar el efecto de un producto sobre poblaciones de garrapatas presentes en el animal, sino de observar el efecto de un inmunógeno —que requiere tiempo para generar y consolidar una respuesta inmune— sobre poblaciones de larvas con las cuales se desafían los animales vacunados, no fue necesario ni aplicable realizar infestaciones con garrapatas con anterioridad a la vacunación.

De hecho, en estudios preliminares de Johnston y col. (1986) y Kemp y col. (1986), sobre inmunización de bovinos contra *B. microplus* usando extractos de garrapatas, las infestaciones (desafío) con larvas se iniciaron después de la última dosis de inmunógeno (21 días en un ensayo y 35 días en otro).

Adicionalmente, las infestaciones pre-vacunación generan anticuerpos que pueden dificultar sensiblemente la interpretación de los resultados, ya que no sería posible distinguir entre los anticuerpos producidos por la vacunación y los producidos por las infestaciones previas a la misma.

En consecuencia, en la presente investigación se emplearon los índices que a continuación se describen.

## Índices utilizados

$GS$  = Número de garrapatas colectadas diariamente por ternero

$$IS = \left( \frac{\text{Promedio } GS \text{ Control}}{GS \text{ Vacunado}} \right) \times 100$$

$$IRS = \left( \frac{\text{Promedio } GS \text{ Control} - GS \text{ Vacunado}}{\text{Promedio } GS \text{ Control}} \right) \times 100$$

$IO$  = Peso (g) de la masa de huevos obtenida de las garrapatas incubadas

$$IRO = \left( \frac{\text{Promedio } IO \text{ Control} - IO \text{ Vacunado}}{\text{Promedio } IO \text{ Control}} \right) \times 100$$

$$IE = \frac{\text{No. de Cascarones} \times 100}{\text{No. de Cascarones} + \text{Huevos infértiles}}$$

$$IRE = \left( \frac{\text{Promedio } IE \text{ Control} - IE \text{ Vacunado}}{\text{Promedio } IE \text{ Control}} \right) \times 100$$

$$IPR = \left( \frac{IO}{\text{No. Teleoginas incubadas}} \right) \left( \frac{IE}{100} \right) (20000) (\text{Peso huevos incubados})$$

$$IIR = \left( \frac{\text{Promedio } IPR \text{ Control} - IPR \text{ Vacunado}}{\text{Promedio } IPR \text{ Control}} \right) \times 100$$

$$IEG = 100 - \left( IS - \frac{IS \times IIR}{100} \right)$$

## Determinación de anticuerpos

Los sueros colectados en los días 0, 30, 60, 90, 120 y 150 del estudio fueron sometidos a la prueba inmunoenzimática ELISA para determinar el nivel de anticuerpos producidos contra *B. microplus*. Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Javeriana bajo la conducción del Dr. Orlando Torres.

## **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de cada una de las observaciones fueron registrados manualmente y en medio magnético para su posterior examen.

La comparación de los diferentes parámetros entre los bovinos controles y los vacunados se realizó mediante la prueba t de Student.

La relación entre niveles de anticuerpos observados y el grado de protección conferido se estableció mediante análisis de correlación.

## **Duración del estudio**

El estudio tuvo una duración de 150 días.

## 4. Resumen de Parámetros

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>
GS	Garrapatas sobrevivientes	Número de garrapatas colectadas diariamente por ternero
IS	Índice de Supervivencia	Relación entre garrapatas del grupo control y vacunado
IRS	Índice de Reducción de la Supervivencia	Reducción relativa del número de garrapatas
IO	Índice de Oviposición	Peso de la masa de huevos producida
IRO	Índice de Reducción de la Oviposición	Reducción relativa de la oviposición
IE	Índice de Eclosión	Porcentaje de huevos que eclosionan
IRE	Índice de Reducción de la Eclosión	Reducción relativa de la eclosión
IPR	Índice de Potencial Reproductivo	Potencial reproductivo de las teleoginas
IIR	Índice de Inhibición de la Reproducción	Reducción del potencial reproductivo
IEG	Índice de Eficacia Global	Eficacia total del inmunógeno evaluado

Cuadro 1: Resumen de los índices utilizados para evaluar la eficacia de la vacuna TICK-VAC.

## Lista de Abreviaturas

B. microplus	<i>Boophilus microplus</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
CORPOICA	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

## Lista de Símbolos

GS	Garrapatas sobrevivientes
IS	Índice de supervivencia
IRS	Índice de reducción de la supervivencia
IO	Índice de oviposición
IRO	Índice de reducción de la oviposición
IE	Índice de eclosión
IRE	Índice de reducción de la eclosión
IPR	Índice de potencial reproductivo
IIR	Índice de inhibición de la reproducción
IEG	Índice de eficacia global

## 5. Resultados

Los resultados del estudio se resumen en las Tablas 1 a 6 y en las Figuras 1 a 9. Se incluyen como anexos las operaciones correspondientes a los análisis estadísticos fecha a fecha.

### Efecto sobre la Producción de Teleoginas

La producción diaria de teleoginas, llamada también Garrapatas Sobrevivientes (GS), no fue significativamente diferente entre los bovinos vacunados y los controles hasta el día 88 del estudio.

A partir del día 89 (29 días después de la tercera dosis de vacuna) y hasta el día 105 (con excepción de los días 91, 96 y 98), el número de garrapatas producidas en el grupo de terneros vacunados fue estadísticamente inferior ( $p < 0,05$ ) al registrado en el grupo control sin tratamiento.

En este grupo, el promedio máximo de teleoginas colectadas fue de 64.83 en el día 98 del estudio, mientras que en el grupo de animales vacunados dicho promedio fue de 36.00, observado en el día experimental número 86.

La Figura 1 ilustra la información anterior.

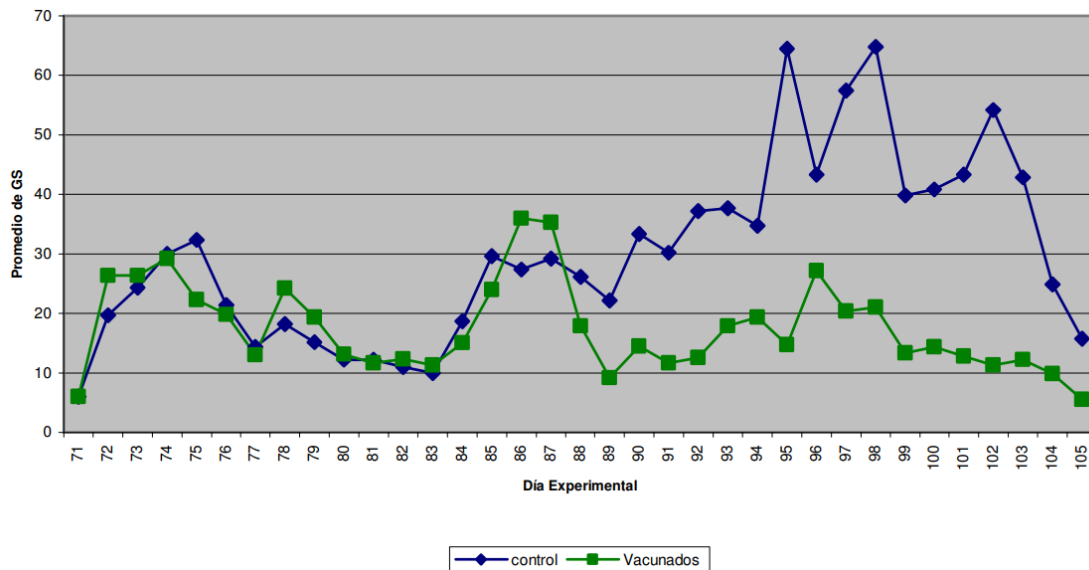


Figura 1: Promedio de producción diaria de teleoginas en terneras vacunadas con TICK VAC y en testigos sin tratamiento

Cabe anotar que fue frecuente observar teleoginas provenientes de animales vacunados que presentaban una coloración rojiza, evidentemente anormal.

En concordancia con lo anterior, el Índice de Reducción de la Supervivencia (IRS), o Índice de Reducción de la Producción de Teleoginas en el grupo vacunado, registró valores entre 9.90 % y 44.44 % hasta el día 88 del estudio.

A partir del día 89, la reducción en la producción de teleoginas se incrementó notoriamente, alcanzando una cifra máxima de 79.08 % en el día 102 de la prueba (Figura 2). El IRS promedio para la prueba fue de 44.31 %.

Nota: En el cálculo de este parámetro y en los demás que se refieren a reducción o inhibición, los valores negativos que resultaron, especialmente al comienzo de las observaciones, fueron asimilados a cero (0).

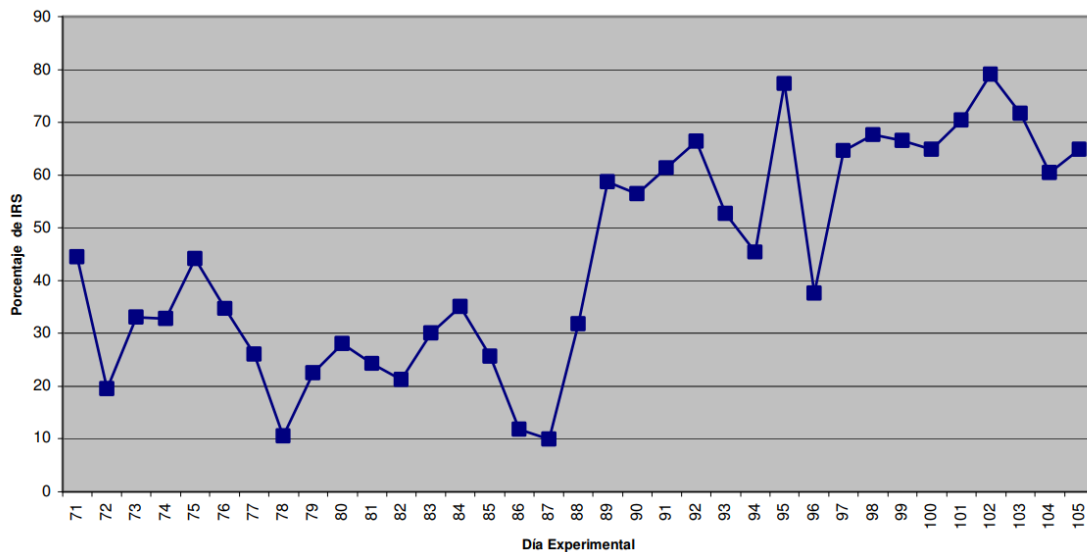


Figura 2: Porcentaje promedio de reducción de teleoginas en terneras vacunadas con TICK VAC.

## Efecto sobre la Oviposición

El Índice de Oviposición (IO) promedio, o el peso promedio de los huevos depositados por teleoginas colectadas de los terneros vacunados con TICK VAC, y el de aquellas obtenidas de animales control sin vacunación, se mantuvieron estadísticamente iguales hasta el día 92 del estudio.

A partir del día 93 (33 días después de la tercera dosis de vacuna), la masa de huevos producida por las teleoginas procedentes de terneros vacunados fue estadísticamente inferior ( $p < 0,05$ ) a la ovipositada por garrapatas obtenidas de los terneros no vacunados.

En las teleoginas de este grupo, la oviposición máxima promedio observada fue de 5.41 (día 95) gramos, mientras que en las del grupo vacunado fue de 3.87 gramos, registrada en el día 74 de la prueba. La Figura 3 representa gráficamente la información anterior.

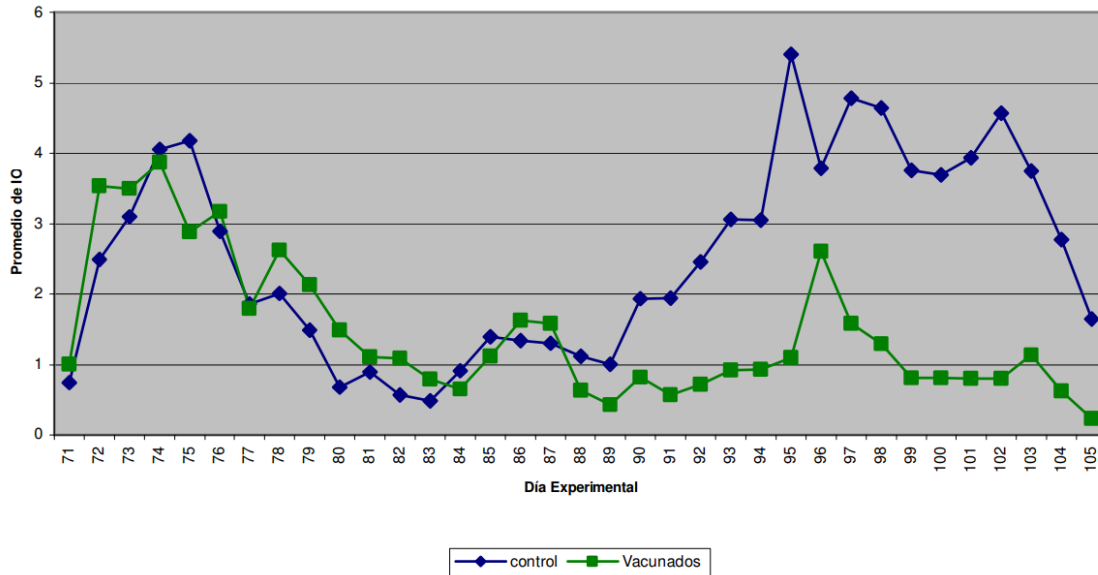


Figura 3: Índice de oviposición promedio de teleoginas obtenidas de terneras vacunadas con TICK VAC y en testigos sin tratamiento

Consecuentemente con los datos de oviposición obtenidos, el Índice de Reducción de este parámetro (IRO) en los terneros vacunados registró valores variables entre 11.41 % y 43.50 % hasta el día 88 de la prueba.

A partir del día 89, la reducción de la oviposición aumentó considerablemente y se mantuvo alta, con excepción del día 96 (37.72 %), hasta el final del experimento (véase Figura 4). El promedio de reducción de la oviposición para la prueba fue de 48.88 %.

## Efecto sobre la Eclosión de los Huevos

La eclosión de los huevos fue severamente perjudicada por la vacunación. Este parámetro se vio afectado aún en los huevos provenientes de las primeras teleoginas colectadas el día 71 del ensayo (11 días después de la tercera dosis de vacuna) y continuó así durante todo el estudio.

El porcentaje de eclosión en huevos depositados por garrapatas colectadas de los terneros vacunados fue muy inferior al de huevos obtenidos de teleoginas del grupo control. La diferencia estadística fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Mientras que en los huevos de teleoginas de terneros vacunados el porcentaje de eclosión varió desde 12.37% en el día 86 hasta 50.57% en el día 71, dicho porcentaje, en huevos de teleoginas caídas de los terneros controles, fluctuó entre 74.57% en el día 78 y 91.96% en el día 71 (Figura 5).

El Índice de Reducción de la Eclosión (IRE), en los huevos producidos por garrapatas

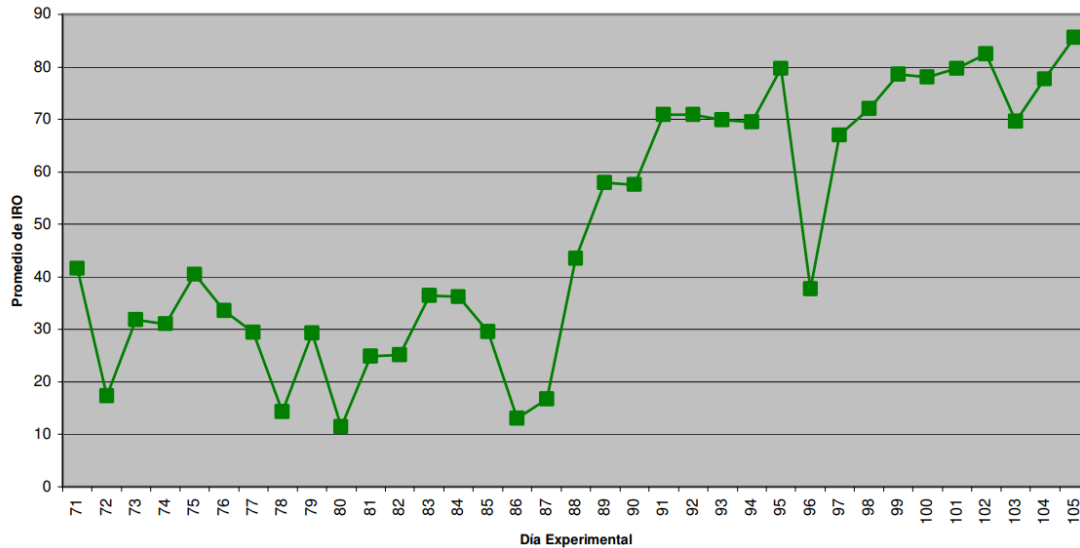


Figura 4: Porcentaje de reducción de oviposición en garrapatas colectadas de terneras vacunadas con TICK VAC

desprendidas de los terneros vacunados, varió desde un mínimo de 45.01 % en el día 71 de la prueba, hasta un máximo de 83.78 % en el día 86 de la misma, manteniéndose por encima del 69 % desde el día experimental número 86 hasta el final de la investigación.

La Figura 6 ilustra la información mencionada. El promedio de reducción de eclosión para la prueba fue de 69.02 %.

## Efecto sobre el Potencial Reproductivo

El Índice de Potencial Reproductivo (IPR) es un parámetro que conjuga o agrupa los demás parámetros observados (número de garrapatas, oviposición y eclosión) para dar una apreciación general del grado en que las teleoginas se pueden reproducir competentemente.

En el presente estudio, el Potencial Reproductivo de las garrapatas producidas en terneros vacunados con TICK VAC® fue significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) en 29 de los 35 días de colección al registrado por garrapatas provenientes de terneros testigos sin vacunar.

Más aún, desde el día 92 hasta el final de la prueba, tal diferencia fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

La Figura 7 representa la información descrita.

La Inhibición de la Reproducción (IIR) en las garrapatas producidas en terneros vacunados con TICK VAC® varió desde 49.71 % en el día 72 del estudio hasta 97.53 % en el último día de la observación (ver Figura 8).

El promedio de Inhibición del Potencial Reproductivo para todo el ensayo en las garra-

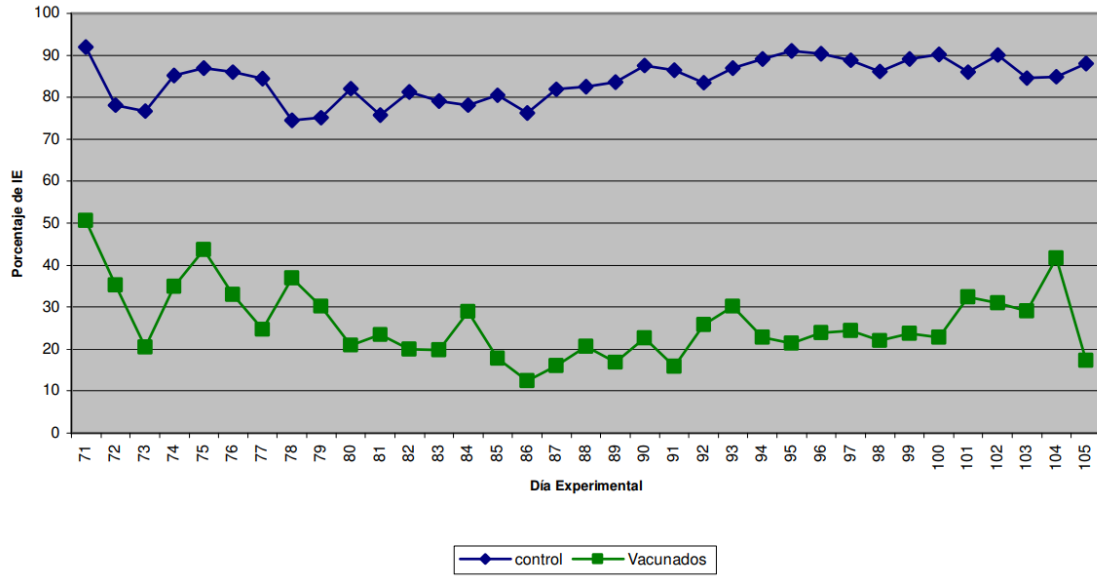


Figura 5: Porcentaje de eclosión (IE) promedio en huevos de teleginas colectadas de terneras vacunadas con TICK VAC y en testigos sin vacunar.

patas de animales vacunados fue de 74.60 %.

La información detallada sobre promedios día a día de los parámetros GS, IO, IE e IPR se presenta en la Tabla 2, y la información correspondiente a los parámetros IRS, IRO, IRE e IIR se presenta en la Tabla 3.

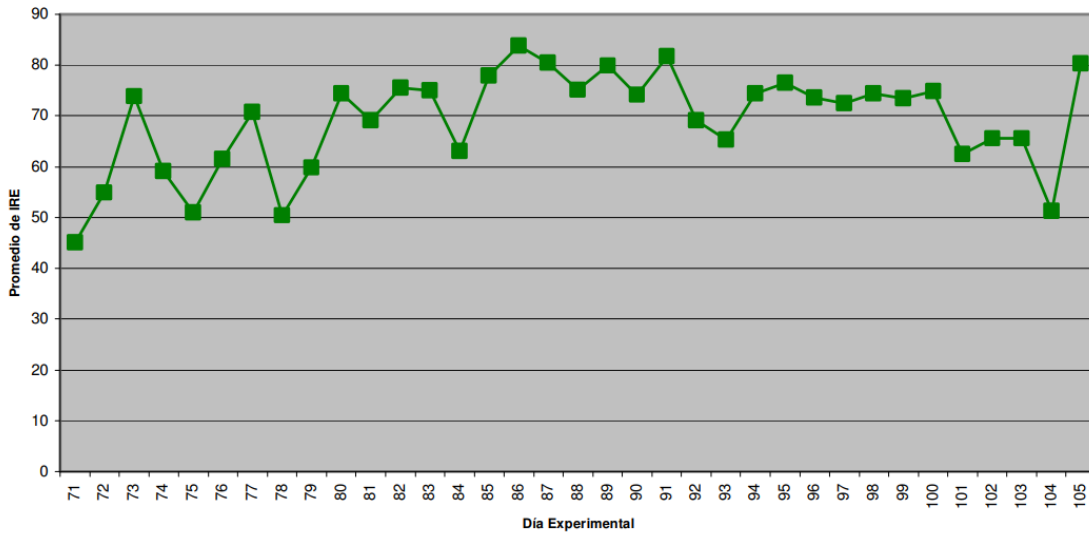


Figura 6: Índice de reducción de eclosión (IRE) en huevos de garrapatas colectadas de terneras vacunadas con TICK VAC.

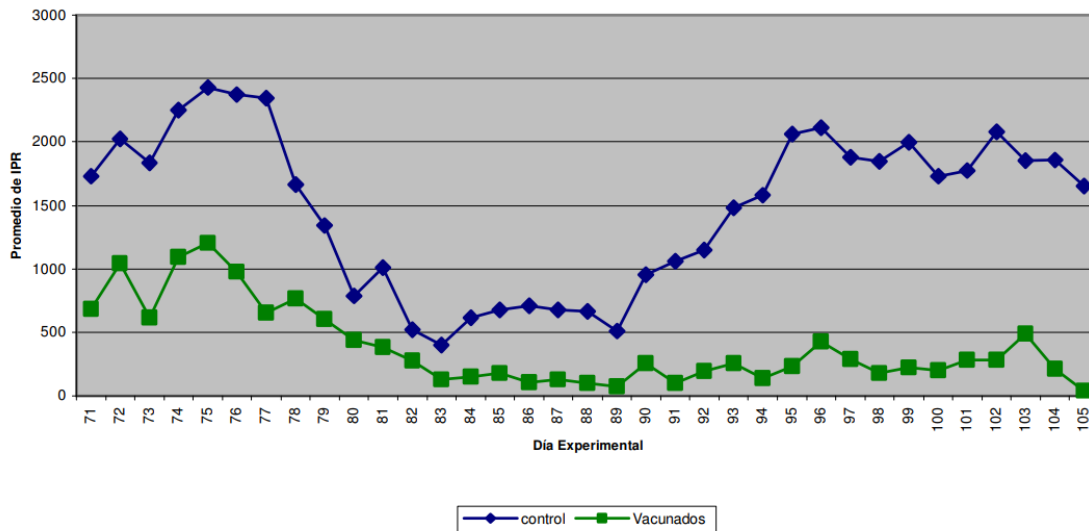


Figura 7: Índice de potencial reproductivo (IPR) promedio en garrapatas obtenidas de terneras vacunadas con TICK VAC y en testigos sin vacunación.

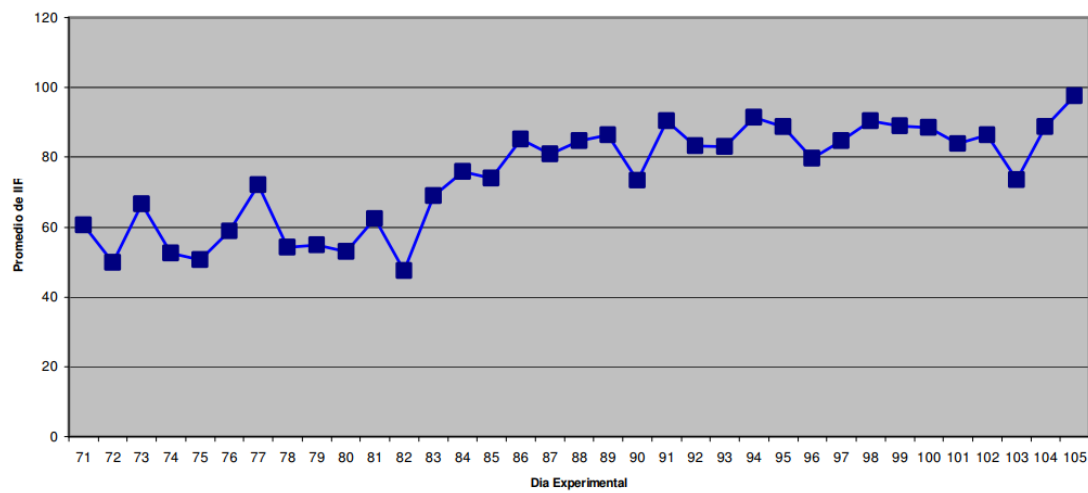


Figura 8: Índice de inhibición de la reproducción en garrapatas producidas por terneras vacunadas con TICK VAC.

Cuadro 2: Promedios de garrapatas (GS) y sus índices de oviposición (IO), eclosión (IE) y potencial reproductivo (IPR), producidas por terneros vacunados con TICK VAC® y por controles sin vacunación.

DÍA	GS CONTR	GS VACU	IO CONTR	IO VACU	IE CONTR	IE VACU	IPR CONTR	IPR VACU
71	6.00	6.00	0.74	1.00	91.96	50.57	1728.58	683.66
72	19.67	26.33	2.50	3.54	78.12	35.20	2025.99	1043.52
73	24.33	26.33	3.10	3.50	76.75	20.48	1838.01	615.11
74	30.00	29.17	4.06	3.87	85.26	34.89	2252.28	1091.42
75	32.33	22.33	4.18	2.88	87.02	43.77	2429.36	1201.24
76	21.33	19.83	2.90	3.17	86.01	33.06	2371.62	977.16
77	14.33	13.00	1.86	1.80	84.43	24.72	2345.33	655.44
78	18.17	24.17	2.01	2.63	74.57	36.98	1666.16	763.19
79	15.17	19.33	1.49	2.13	75.09	30.22	1344.08	606.57
80	12.17	13.17	0.68	0.49	82.11	20.96	785.70	435.67
81	12.17	11.67	0.89	1.10	75.85	23.42	1009.20	379.92
82	11.00	12.33	0.57	1.09	81.25	19.90	520.47	279.82
83	10.00	11.33	0.49	0.79	79.10	19.76	398.21	127.79
84	18.67	15.00	0.91	0.65	78.17	28.87	615.59	148.92
85	29.67	24.00	1.40	1.11	80.43	17.76	675.25	176.25
86	27.33	36.00	1.34	1.63	76.26	12.37	711.47	105.75
87	29.17	35.33	1.30	1.58	81.88	15.97	678.82	129.69
88	26.17	17.83	1.12	0.63	82.59	20.56	664.26	102.34
89	22.17	9.17	1.01	0.42	83.67	16.88	509.28	69.54
90	33.33	14.50	1.93	0.82	87.63	22.62	952.20	253.42
91	30.17	11.67	1.95	0.57	86.41	15.81	1061.92	102.09
92	37.17	12.50	2.46	0.72	83.53	25.84	1150.26	192.46
93	37.67	17.83	3.06	0.92	86.96	30.19	1481.97	252.97
94	34.67	17.83	3.06	0.93	89.10	22.78	1579.48	136.27
95	64.50	14.67	5.41	1.10	91.10	21.43	2060.69	232.51
96	43.33	27.17	3.78	2.60	90.33	23.91	2114.38	428.94
97	57.50	20.33	4.78	1.58	88.82	24.42	1877.72	286.90
98	64.83	21.00	4.64	1.30	86.18	22.08	1848.13	176.83
99	39.83	13.33	3.76	0.81	89.15	23.70	1994.92	219.90
100	40.83	14.33	3.69	0.81	90.23	22.75	1728.78	200.51
101	43.33	12.83	3.93	0.80	86.06	32.32	1772.67	284.44
102	54.17	11.33	4.57	0.80	90.13	30.98	2077.15	285.18
103	42.83	12.17	3.12	1.14	84.64	29.11	1850.16	490.62
104	24.83	9.83	2.77	0.62	84.93	41.59	1859.24	209.65
105	15.67	5.50	1.65	0.24	87.98	17.37	1653.91	40.92

Cuadro 3: Promedios de reducción de la supervivencia (IRS), de la oviposición (IRO), de la eclosión (IRE) y de la reproducción (IIR), en garrapatas de terneros vacunados con TICK VAC®.

DÍA	IRS (%)	IRO (%)	IRE (%)	IIR (%)
71	44.44	41.63	45.01	60.45
72	19.49	17.40	54.95	49.71
73	33.11	31.83	73.87	66.56
74	32.78	31.07	59.08	52.53
75	44.16	40.47	51.02	50.74
76	34.64	33.53	61.56	58.80
77	25.97	29.45	70.72	72.05
78	10.55	14.32	50.41	54.70
79	22.53	29.28	59.75	54.87
80	28.08	11.41	74.47	53.00
81	24.20	24.91	69.12	62.35
82	21.21	25.19	75.51	47.58
83	30.00	36.43	75.02	69.00
84	35.12	36.26	63.06	75.81
85	25.66	29.60	77.92	73.90
86	11.79	13.07	83.78	85.14
87	9.90	16.67	80.50	80.90
88	31.85	43.50	75.10	84.59
89	58.65	57.95	79.83	86.35
90	56.50	57.55	74.19	73.39
91	61.33	70.95	81.70	90.39
92	66.37	70.88	69.07	83.27
93	52.65	69.92	65.28	82.93
94	45.35	69.56	74.43	91.37
95	77.26	79.72	76.48	88.72
96	37.56	37.72	73.53	79.71
97	64.64	66.95	72.50	84.72
98	67.61	72.06	74.38	90.43
99	66.53	78.51	73.42	88.98
100	64.69	78.05	74.79	88.40

DÍA	IRS (%)	IRO (%)	IRE (%)	IIR (%)
101	70.38	79.70	62.45	83.95
102	79.08	82.46	65.63	86.27
103	71.60	69.70	65.61	73.50
104	60.40	77.63	51.31	88.72
105	64.89	85.61	80.26	97.53
PROM.	44.31	48.88	69.02	74.60

## Comentario sobre Eficacia Global

Aunque la fórmula propuesta para estimar este parámetro parece lógica, ya que combina el número de Garrapatas Sobrevivientes y lo reduce aplicando a las mismas el Índice de Inhibición de la Reproducción, los porcentajes obtenidos son demasiado altos y no reflejan la situación real, especialmente en los primeros 88 días del estudio.

Por esta razón, el autor del presente trabajo considera que, en el presente caso, el Índice de Inhibición de la Reproducción (IIR), similar al Porcentaje de Control de la Eficiencia Reproductiva (PCONER) usado en otros estudios, y el cual registró valores entre 49.71 % y 97.53 %, con un promedio de 74.60 %, debe ser el indicador de eficacia a elegir.

De otro lado, la eficacia inicialmente sugerida por LIMOR DE COLOMBIA S.A. de “50 % sobre teleoginas”, por sí sola no contempla parámetros considerados por el IIR, ya que deja por fuera aspectos importantes del ciclo y de la reproducción, como son el Índice de Oviposición (IO) y el Índice de Eclosión (IE), los cuales inciden mucho en la contaminación de los potreros con larvas, hecho que en la práctica es importante reducir.

## Serología

Para la interpretación de los resultados de la prueba de ELISA se empleó el siguiente criterio: niveles de absorbancia por debajo de 0.673 se consideraron negativos, y niveles por encima de 0.673 se tomaron como positivos.

La Tabla 4 presenta los valores promedio de absorbancia observados en los sueros de terneros vacunados y en los procedentes de terneros sin vacunación.

Cuadro 4: Absorbancia promedio en sueros de terneros vacunados con TICK VAC® y en animales controles sin vacunación.

DÍA EXPERIMENTAL	ABSORBANCIA PROMEDIO GRUPO CONTROL	ABSORBANCIA PROMEDIO GRUPO VACUNADO
0	0.195	0.214
30	0.327	0.827
60	0.327	0.886
90	0.578	1.104
120	0.763	1.509
150	0.757	0.924

En el día cero (0) del estudio, como era de esperarse, tanto los sueros de los bovinos asignados al grupo de vacunados como los de los asignados al grupo control fueron negativos.

En los días 30, 60 y 90 del estudio, la absorbancia promedio en los sueros de bovinos controles se mantuvo en valores negativos, mientras que en los sueros obtenidos de los animales vacunados fueron positivos, con absorbancias que se incrementaron gradualmente con el tiempo. La diferencia entre valores de los dos grupos fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ) en los días 30, 60 y 90 de la prueba.

Hacia el día experimental 120 (70 días después de la primera infestación con larvas), los sueros de los bovinos controles empezaron a registrar un promedio de absorbancia positivo (0.763). En ese mismo día, la absorbancia promedio registrada para los sueros de los bovinos vacunados fue de 1.509 (el nivel máximo detectado en el estudio), siendo la diferencia entre los grupos altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

En el día 150 (100 días después de la primera infestación con larvas), los sueros de los bovinos controles continuaron registrando valores de absorbancia positivos pero aún bajos (0.757), los cuales no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) a los observados para el grupo de animales vacunados (0.924). La Figura 9 ilustra los resultados anteriores.

## Vía de Administración

Los valores del Índice de Inhibición de la Reproducción (IIR) en teleoginas obtenidas de terneros vacunados por vía intramuscular fueron comparados con los de las de terneros vacunados por vía subcutánea. El análisis estadístico (ver Anexo) no evidenció diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre tales valores, atribuible a la vía de administración de la vacuna.

## Reacciones Indeseables

Aunque no se contempló en el protocolo el seguimiento a estas reacciones y su estudio fue motivo de una prueba separada (Prueba de Seguridad), ejecutada para tal fin, no se observó

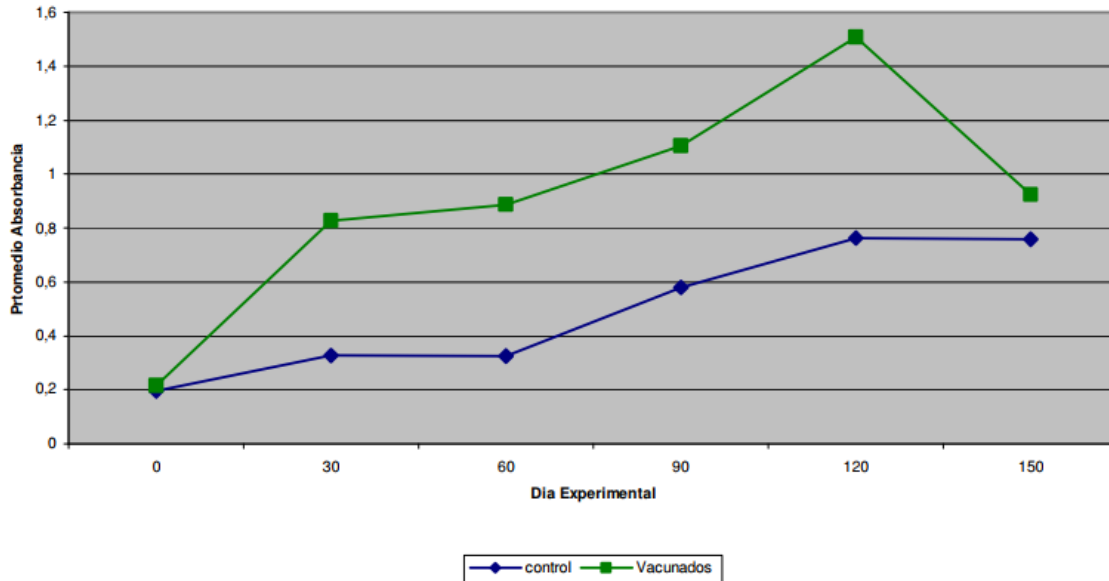


Figura 9: Promedio de absorbancia (1/1024) en terneras vacunadas con TICK VAC y en testigos sin tratamiento

reacción indeseable alguna de carácter local o sistémico asociada con la vacunación.

## Temperatura

Entre los días octubre 13 y octubre 22 (días 65 y 74 del experimento), todos los animales, aunque en días diferentes, evidenciaron incrementos de temperatura, los cuales, después del respectivo examen de extendido sanguíneo coloreado, fueron asociados con anaplasmosis.

Sin embargo, los promedios de este parámetro no reflejaron la condición febril presentada individualmente por algunos animales en algunos de los días mencionados. La presencia de *Anaplasma marginale* no puede ser atribuida a las larvas empleadas para las infestaciones, ya que el episodio febril se inició tan sólo 15 días después de la primera de ellas, lo cual es un período muy corto para la incubación del parásito.

Se consideró que los terneros, en su transporte hacia la Unidad de Ectoparásitos, tuvieron oportunidad de infestarse a través de moscas hematófagas. Una vez resueltos los casos clínicos con ayuda de oxitetraciclina, antipiréticos y hematopoyéticos, la temperatura se conservó normal durante el resto de la prueba.

La Tabla 5 presenta los valores de temperatura para los terneros vacunados y los controles sin vacunación.

Cuadro 5: Temperatura promedio de terneros vacunados con TICK  
VAC y animales controles sin tratamiento.

DÍA	TEMP. CONTROL (°C)	TEMP. VACUNADO (°C)	DÍA	TEMP. CONTROL (°C)	TEMP. VACUNADO (°C)
0	38.83	38.63	76	38.00	38.23
1	38.90	39.03	77	38.25	38.10
2	39.03	39.15	78	38.95	38.11
3	39.00	39.18	79	38.00	38.43
4	38.90	38.96	80	39.03	39.23
5	38.70	38.86	81	39.00	38.45
6	38.83	38.81	82	38.43	38.80
7	38.81	38.90	83	38.63	38.91
8	38.65	38.81	84	38.45	38.56
9	38.76	39.05	85	38.66	38.81
10	38.80	38.86	86	37.98	38.53
11	38.81	38.83	87	38.33	38.50
12	38.75	38.86	88	38.30	38.71
13	38.78	38.90	89	38.33	38.43
14	38.78	38.88	90	38.65	38.61
15	38.85	39.03	91	38.45	38.06
16	38.90	38.90	92	38.78	38.56
17	38.36	38.93	93	38.55	38.43
18	38.75	38.96	94	38.95	38.26
19	38.91	38.96	95	39.33	38.51
20	38.70	38.78	96	38.60	38.20
21	38.71	38.85	97	38.61	38.65
22	38.81	38.90	98	38.20	38.38
23	38.73	38.80	99	38.36	38.58
24	38.73	38.93	100	38.25	38.53
25	38.91	38.86	101	38.23	38.20
26	38.75	38.00	102	38.31	38.28
27	38.86	38.80	103	38.30	38.55
28	38.90	38.08	104	38.55	38.45
29	38.75	38.66	105	38.28	38.45
30	38.83	38.81	106	37.96	38.15
31	38.68	38.83	107	38.23	38.33
32	38.65	38.80	108	38.38	38.41
33	38.53	38.76	109	38.45	38.48
34	38.33	38.31	110	38.28	38.46
35	38.31	38.46	111	37.91	38.01
36	38.31	38.63	112	38.03	38.31
37	38.33	38.45	113	38.10	38.36
38	38.35	38.41	114	38.08	38.21
39	38.40	38.26	115	38.20	38.28

DÍA	TEMP. CONTROL (°C)	TEMP. VACUNADO (°C)	DÍA	TEMP. CONTROL (°C)	TEMP. VACUNADO (°C)
40	38.38	38.20	116	37.98	38.26
41	38.30	38.20	117	38.33	38.50
42	38.31	38.38	118	38.48	38.46
43	38.55	38.56	119	38.13	38.15
44	38.30	38.25	120	38.18	38.48
45	38.35	38.65	121	38.15	38.50
46	38.46	38.20	122	38.26	38.28
47	38.15	38.36	123	38.60	38.70
48	38.20	38.25	124	38.30	38.33
49	37.96	38.18	125	38.75	38.55
50	38.01	38.28	126	38.56	38.55
51	38.00	38.13	127	38.10	38.06
52	38.26	38.31	128	38.11	38.31
53	38.33	38.33	129	38.23	38.35
54	38.51	38.68	130	38.05	37.96
55	38.23	38.13	131	38.51	38.65
56	38.18	38.31	132	38.55	38.50
57	38.33	37.96	133	38.63	38.76
58	38.30	38.25	134	38.35	38.18
59	38.23	38.40	135	38.41	38.45
60	37.85	38.55	136	38.00	38.20
61	38.10	38.40	137	38.23	38.06
62	38.11	38.00	138	38.33	38.18
63	38.05	37.95	139	38.31	38.38
64	38.13	38.03	140	38.18	38.23
65	38.51	38.36	141	38.08	38.18
66	38.65	38.61	142	38.08	38.01
67	38.58	38.26	143	38.31	38.51
68	38.43	38.43	144	38.13	38.66
69	38.96	38.95	145	38.20	38.50
70	38.85	38.98	146	38.23	38.60
71	38.75	38.41	147	38.43	38.58
72	38.56	38.40	148	38.15	38.20
73	38.75	38.56	149	38.08	38.56
74	39.13	38.43	150	38.43	38.60
75	38.41	38.16			

## Hematocrito

Los valores del hematocrito se conservaron normales a lo largo del estudio, tanto en los bovinos vacunados como en los controles. El valor promedio de este parámetro varió entre 26.33 % y 31.60 % en los terneros controles y entre 27.33 % y 36.00 % en los vacunados. El

valor individual mínimo observado fue de 20.6 % en uno de los terneros (No. 11) durante el episodio de anaplasmosis arriba mencionado (véase Tabla 6).

Cuadro 6: Valores promedio del hematocrito en bovinos vacunados con TICK VAC® y en terneros controles sin vacunación.

DÍA EXPERIMENTAL	PROMEDIO HEMATOCRITO GRUPO CONTROL (%)	PROMEDIO HEMATOCRITO GRUPO VACUNADO (%)
0	31.33	29.83
15	31.17	30.00
30	28.33	36.00
45	31.50	31.50
60	31.60	30.80
75	29.58	27.83
90	26.72	28.17
105	26.33	27.33
120	28.50	30.33
135	29.30	28.18
150	29.18	28.57

## Peso

El peso promedio inicial de los terneros del grupo control y el de los del grupo vacunado fue básicamente igual (120.66 kg y 121.0 kg, respectivamente). Al final del estudio, la ganancia de peso en ambos grupos fue de 34.50 kg para el grupo control y 39.66 kg para el grupo vacunado, presentándose una ligera diferencia a favor de este último. La Tabla 7 presenta la información anterior.

Cuadro 7: Promedio de peso inicial, peso final y ganancia en terneros vacunados con TICK VAC® y en animales controles sin vacunar.

GRUPO	ANIMAL NÚMERO	PESO INICIAL (Kg)	PESO FINAL (Kg)	GANANCIA (Kg)
Control	1	186	210	24
	2	107	143	36
	3	119	154	35
	4	116	158	42
	5	104	131	27
	6	92	135	43
Promedio		120.66	155.16	34.50
Control	7	182	215	33
	8	125	170	45
	9	113	154	41
	10	89	138	49
	11	110	162	52
	12	107	125	18
Promedio		121.0	160.66	39.66

## 6. Conclusiones

- La vacuna TICK VAC® redujo significativamente el número y la capacidad reproductiva de las garrapatas *Boophilus microplus* que trataron de establecerse en los bovinos vacunados.
- La producción de teleoginas en los bovinos vacunados con TICK VAC® sufrió una reducción promedio de 44.31 %, alcanzando una cifra máxima de 79.01 % hacia el final de la prueba.
- La vacuna TICK VAC® afectó sensiblemente la capacidad de la garrapata para ovipositar. El índice promedio de reducción de la oviposición en los terneros vacunados fue de 48.88 %.
- Tanto el número de teleoginas producidas como su oviposición se vieron afectadas a partir del día 88 de la prueba, aproximadamente un mes después de la tercera dosis de vacuna.
- La eclosión de los huevos no sólo fue uno de los parámetros más afectados por la vacunación con TICK VAC®, sino el que se vio comprometido más temprano en el estudio (11 días después de la tercera dosis de vacuna). El promedio de reducción de la eclosión en garrapatas producidas por los bovinos vacunados fue de 69.02 %.
- El potencial reproductivo total de las garrapatas (el cual combina la reducción en número, oviposición y eclosión) producidas por los terneros vacunados con TICK VAC® fue severamente afectado. El porcentaje promedio de reducción de la reproducción en garrapatas producidas por los terneros vacunados fue de 74.60 %.
- Los terneros vacunados con TICK VAC® respondieron a la vacunación produciendo anticuerpos contra el inmunógeno en forma creciente desde el día 30 de su aplicación, alcanzando niveles máximos en el día 120 del estudio y conservando valores positivos hasta el día 150 del mismo.
- El estudio demostró que se requieren las tres dosis de vacuna para consolidar una respuesta inmune efectiva, la cual, en las condiciones de la prueba, empezó a expresarse entre los 11 y 28 días después de la aplicación de la tercera dosis.
- Los animales vacunados con TICK VAC® en la presente Prueba de Establo no evidenciaron reacciones locales ni generales desfavorables asociadas con la aplicación de la vacuna.

- Los resultados del presente estudio muestran a la vacuna TICK VAC® como una alternativa limpia y segura para el control de la garrapata *Boophilus microplus*, alternativa que puede ser incorporada a programas de manejo integrado de las infestaciones del ganado bovino por dicho parásito.

## 7. Agradecimientos

El autor del presente informe agradece a LIMOR DE COLOMBIA S.A. por la confianza depositada en él y la oportunidad de adelantar la Prueba de Establo en condiciones de comodidad y objetividad científica. Igualmente agradece a CORPOICA, Centro de Investigación Palmira, por haber facilitado el uso de las instalaciones y equipos de la Unidad de Ectoparásitos; y a las funcionarias del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Dras. Mary Luz Villamil y Liliana Cadavid, por la supervisión y aportes proporcionados a la prueba.

**JESÚS ANTONIO BETANCOURT ECHEVERRY**

M.V.Z.; M.Sc.; Ph.D.

Asesor en Parasitología Veterinaria

## 8. Investigadores Responsables

La prueba de establo propiamente dicha fue realizada por el Dr. Jesús Antonio Betancourt E.

Las pruebas serológicas estuvieron a cargo del Dr. Orlando Torres.

## 9. Bibliografía

1. Benavides, O.E.; Hernández, M.; Romero, N.A.; Castro, A.H. y Rodríguez, B.J. 2001. Evaluación preliminar de extractos de Neem (*Azadiracta indica*) como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida). *Revista Colombiana de Entomología*. 27: 1–2.
2. Betancourt, A. 1996. Tratamientos estratégicos y control integrado de la garrapata. En: Pfizer: Memorias Seminario Internacional de Parasitología. Paipa, Nov. 22–24. p. 11–16.
3. Betancourt, A. 2001. Manejo no químico de garrapatas con énfasis en el empleo del hongo *Metarhizium anisopliae*. Conferencia dictada en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Antonio Nariño. Popayán. 8 p.
4. Cassalet, E.R. 2001. Alternativas de control de cepas de garrapatas multiresistentes. En: Seminario Internacional de Enfermedades Parasitarias en Bovinos. MERIAL. Bogotá, AGROEXPO. Julio 13–14. 14 p.
5. Drummond, R.O.; Gladney, W.J.; Whetstone, T.M. and Ernst, S.E. 1971. Laboratory testing of insecticides for the control of the winter tick. *Journal of Economic Entomology*. 64: 686–688.
6. Drummond, R.O.; Ernst, S.E.; Trevino, J.L.; Gladney, W.J. and Graham, O.H. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* laboratory tests for insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66: 130–133.
7. FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. pp. 26–42.
8. Johnston, L.A.Y.; Kemp, D.H. and Pearson, A.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunization on tick populations. *International Journal for Parasitology*. 16: 27–34.
9. Kemp, D.H.; Agbede, R.I.S.; Johnston, L.A.Y. and Couge, J.M. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus*, using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International Journal for Parasitology*. 16: 115–120.
10. Kemp, D.H.; Holdsworth, P.A. and Green, P.E. 2003. Registration of products for *Boophilus* control. Suggestions for change from experiences in Australia. Proceedings

- V International Seminar in Animal Parasitology. October 1–3, 2003. Mérida, Yucatán, México. pp. 1–10.
11. Oliveros, J.; Rois, E.; Benavides, E. y Wilches, M. 1996. Evaluación *in vitro* de posibles propiedades de la semilla de mamey (*Mammea americana*) en el control de la garrapata *Boophilus microplus*. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Riohacha, Guajira. Octubre 1996. 11 p.
  12. Pareja, I. y Gómez, G. (Editores). 2004. Determinación taxonómica del análisis poblacional de especies predominantes de garrapatas y comportamiento de la vacuna TICK VAC en cinco regiones ganaderas de Colombia. Convenio Universidad de La Salle, Facultad de Zootecnia y LIMOR de Colombia. Presentación en disco compacto.
  13. Portela, R.; Rodríguez, C.E.; Betancourt, A.; Quintero, M.; Velásquez, C.; Domínguez, A. y Hernández, A. 2003. Medicina herbaria en el control de ectoparásitos de bovinos. CORPOICA – PRONATTA. Boletín Técnico No. 24. Diciembre. 32 p.
  14. Rodríguez, M.; Penichet, M.L.; Mouris, A.E. y otros. 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 preparation. *Veterinary Parasitology*. 57: 339–349.
  15. Roulston, W.J.; Stone, B.F.; Wilson, J.T. and White, L.I. 1968. Chemical control of an organophosphorus and carbamate resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) from Queensland. *Bulletin of Entomological Research*. 58: 379–392.
  16. Thulner, R. 1997. Impact of pesticide resistance and network for global pesticide resistance management based on a regional structure. *World Animal Review*. 89: 41–47.
  17. Walker, A.R.; Benavides, E. and Betancourt, A. 1988. Uso del concepto manejo integrado de plagas para el control de garrapatas. *Carta Ganadera*. 25(8): 52–57.
  18. Willadsen, P.; Bird, P.E.; Cobon, G.S. and Hungerford, J. 1995. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*. 110: 543–550.
  19. Willadsen, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*. 71: 209–222.