



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN CON
SUBOLESIN SOBRE LA INFESTACIÓN DE
GARRAPATAS *Boophilus microplus* Y
Boophilus annulatus EN BOVINOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

RODOLFO ESTEBAN LAGUNES QUINTANILLA

TUTOR: CONSUELO ALMAZÁN GARCÍA

**COMITÉ TUTORAL: RODRIGO ROSARIO CRUZ
HÉCTOR QUIROZ ROMERO**

México, D. F.

Octubre, 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis de Maestría a todas las personas que creyeron en mí...

La primera de ellas es mi madre, quien con sus consejos, ayuda y atención logró encaminarme por la senda del éxito, esta tesis es un logro más, resultado de todo su apoyo y toda su confianza. Con cariño, admiración y respeto para ti:

Laura Quintanilla Martínez

Algo muy especial para mí han sido tres personas a lo largo de mi vida, a las cuales les agradezco todas sus atenciones. Siempre han estado ahí cuando los necesito y eso se los agradezco infinitamente. Por brindarme siempre su ayuda y amistad en todo momento de mi vida. Con mucho cariño a mi hermana, mi primo y mi tío:

Dania Lagunes Quintanilla

Raúl Sotres Quintanilla

Sabino Cruz Hernández

A un buen amigo que me encontré en el camino, que me apoyó en cada momento para alcanzar este objetivo y a quien siempre estaré agradecido por todos sus consejos, su amistad y su confianza. Para ti amigo:

Martín Ortiz Estrada

Y muy especialmente para las dos personas más importantes que han pasado por mi vida, que gracias a ellos he llegado a donde estoy, que siempre los llevo en mi corazón y que se que disfrutan este éxito tanto como yo. Es por ellos que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida:

José Guadalupe Quintanilla Muñiz

Amparo Martínez Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de Investigación fue financiado a través de los proyectos FOMIX–TAMAULIPAS 73622; The Wellcome Trust, 0757990 y Programa de Cooperación Internacional, Unión Europea 510561 bajo la responsabilidad de la Dra. Consuelo Almazán García y el Dr. José de la Fuente García respectivamente.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del convenio 221776 por el financiamiento de beca otorgado para sustentar mis estudios de maestría.

Agradezco también las facilidades brindadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas en especial a la Dra. Consuelo Almazán García, para la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a los miembros del comité tutorial Dr. Rodrigo Rosario Cruz y al Dr. Héctor Quiroz Romero por sus acertados consejos, comentarios y por aceptar formar parte de este proyecto de investigación.

Hago extensivo mis agradecimientos al personal del laboratorio de parasitología de la FMVZ-UAT por su asesoría y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto en especial a Alejandro González, Uriel Valdez, Octavio Merino, Vladimir Guerrero y Baldomero Ibarra por apoyarme durante el trabajo de campo. Muchas Gracias.

Agradezco los comentarios y sugerencias realizados por el comité revisor de esta tesis conformado por el Dr. Froylan Ibarra Velarde, Dr. Sergio D. Rodríguez Camarillo, Dr. Alfredo Sahagun Ruiz, Dr. Julio V. Figueroa Millan.

RESUMEN

Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* representan el problema de salud más importante de la ganadería bovina de zonas tropicales y subtropicales. Debido a la resistencia a ixodicidas, al impacto al medio ambiente y la salud pública, se requieren alternativas de control de garrapatas diferentes al control químico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inmunización con subolesin sobre la infestación de garrapatas *R. microplus (Rm)* y *R. annulatus (Ra)* en bovinos. Se utilizaron 16 bovinos hembras de razas europeas divididos en 4 grupos; el grupo 1 o testigo recibió solución salina más adyuvante, el grupo 2 subolesin, el grupo 3 subolesin+Bm86 y el grupo 4 Bm86. Todos los animales fueron inmunizados con 3 dosis de 100 µg de proteínas recombinantes mezcladas con adyuvante los días 0, 28 y 42. Se tomaron muestras de sangre antes de cada inmunización y al término del experimento para medir el título de anticuerpos mediante ELISA indirecto. La eficacia general (EG) de la inmunización con subolesin fue de 51% y 60% contra Rm y Ra respectivamente. La EG de subolesin+Bm86 fue de 23% y 56% y para Bm86 fue de 60% y 100%. Los títulos de anticuerpos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) a partir de la segunda inmunización para los grupos subolesin y Bm86. Sin embargo, los grupos inmunizados con subolesin y la combinación subolesin+Bm86 no mostraron diferencias significativas en la tercera inmunización. Se concluye que aunque la EG de los grupos inmunizados con subolesin y la combinación subolesin+Bm86 contra Rm y Ra fue significativa, esta fue menor que el grupo inmunizado con Bm86. Se requiere mejorar los sistemas de adyuvación y el efecto sinérgico de estas proteínas para obtener un mejor control de las infestaciones por garrapatas *R. (Boophilus) spp.*

Palabras clave: Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) spp.*, proteínas recombinantes, Bm86, Subolesin.

ABSTRACT

The cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. represent the most important health problem of livestock from tropical and subtropical areas. Because of tick resistance, the impact of acaricides on environment and public health, new tick control strategies are required. The objective of this research work was to evaluate the effect of immunization with subolesin on *R. microplus* (Rm) and *R. annulatus* (Ra) tick infestations in cattle. Sixteen European 6 months age heifers divided in 4 groups of 4 animals each were used and treated as follows: Group 1 or negative control received adjuvant/saline, group 2 subolesin, group 3 a combination of subolesin+Bm86, and group 4 Bm86. Each animal received 100 µg of recombinant proteins mixed with adjuvant at days 0, 28, and 42. Blood samples were obtained before each immunization and at the end of the experiment in order to evaluate the antibody titers by indirect ELISA. The overall efficacy (OE) of immunization with subolesin was of 51% and 60% for Rm and Ra respectively. The OE for subolesin+Bm86 was of 23% and 56%. The OE for the group immunized with Bm86 was of 60% and 100%. The antibody titers were statistically significant ($p<0.05$) by the time of the second immunization in groups immunized with subolesin and Bm86. However, groups immunized with subolesin and subolesin+Bm86 were not statistically different by the third immunization. It is concluded that even though the OE of subolesin and combination of subolesin+Bm86 against Rm and Ra were significant, it was lower than Bm86. The immunological response for both subolesin and subolesin+Bm86 were not higher than Bm86. Therefore, it is required to improve the adjuvation systems as well as the synergistic effect of these antigens in order to achieve a better control of *R. (Boophilus)* spp. tick infestations.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. ticks, recombinant proteins, Bm86, Subolesin.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VI
/ INTRODUCCIÓN	1
// ANTECEDENTES	3
1. Importancia general de las garrapatas	3
2. Garrapatas de los bovinos.....	4
3. Enfermedades transmitidas por garrapatas.....	4
4. Importancia económica	6
5. Distribución geográfica	6
6. Control.....	7
7. Resistencia a ixodícidas	8
8. Control inmunológico.....	9
8.1 Antígeno Bm86	10
8.2 Antígeno Subolesin	12
/// JUSTIFICACIÓN	13
/V HIPÓTESIS.....	14
V OBJETIVOS.....	14
VI MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1 Localización geográfica	15
6.2 Bovinos.....	15
6.3 Protocolo de inmunización	15
6.4 Infestación	16
6.5 Garrapatas	16
6.6 Determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto.....	17
6.7 Evaluación de resultados	17
6.8 Análisis estadístico	18

VII RESULTADOS.....	19
7.1 Efecto de la vacunación sobre <i>R. microplus</i>	19
7.2 Efecto de la vacunación sobre <i>R. annulatus</i>	20
7.3 Respuesta de anticuerpos en los bovinos inmunizados	22
VIII DISCUSIÓN	25
IX CONCLUSIONES	27
X REFERENCIAS	28

XI CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.....	20
Cuadro 2.....	21
Cuadro 3.....	23
Figura 1	7
Figura 2	24

XII ANEXOS

Anexo 1. Bovinos en los corrales de la posta zootécnica de la FMVZ-UAT.

Anexo 2 A y B. Inmunización de bovinos.

Anexo 3 A. Bovinos en corraletas individuales (infestadero). (B) Colocación de celdas de algodón. (C) Infestación con larvas de garrapatas.

Anexo 4 A. Obtención de muestras de sangre. (B y C) Obtención y almacenamiento de suero.

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería extensiva se conserva como una actividad de relevancia en el contexto socioeconómico del país, ya que en su conjunto con el resto del sector primario, ha sido sustento para el desarrollo de la industria nacional, debido a que proporciona alimentos, materias primas, divisas y empleos, además, distribuye ingresos en el sector rural y utiliza recursos naturales que no tienen cualidades adecuadas para la agricultura u otra actividad pecuaria. En México, esta actividad se desarrolla principalmente en zonas tropicales y subtropicales donde la producción de bovinos para carne, constituye una de las actividades fundamentales del subsector pecuario nacional, por la contribución que realiza a la oferta de productos cárnicos, así como su participación en la balanza comercial del país donde las exportaciones de ganado en pie, es su principal rubro. Se estima que hasta el 2001 la población total de ganado bovino fue de 30'620, 930 cabezas (García, 2003).

La producción de ganado se ve afectada por problemas de salud, donde las garrapatas y las enfermedades que transmiten (GETG) son las principales limitantes. El problema de GETG depende de la región, especies de garrapatas presentes, agente infeccioso transmitido, así como de la situación socioeconómica y el avance tecnológico en la aplicación de las medidas de control. Las garrapatas también producen bajas en la fertilidad del ganado, mayor tiempo en la engorda y dificultad en la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas por garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.* 2006). Las garrapatas del género *Boophilus* spp. posteriormente reclasificadas como *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. (Murrell y Barker, 2003) representan la mayor limitante en el deterioro de la productividad, por lo que una serie de programas han sido implementados desde 1927 para su erradicación y/o control, con la finalidad de disminuir las pérdidas en la producción de carne y leche, así como las muertes ocasionadas por la infección del ganado con agentes hemoparasitarios (FAO, 1987). Específicamente, la garrapata *R. microplus* constituye uno de los ectoparásitos que mayores pérdidas ocasiona en las explotaciones de bovinos. Es vector de los patógenos *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *B. bovis*, hemoparásitos de los bovinos.

Estos agentes se convierten en un grave problema para la ganadería, tanto por los efectos directos como por los efectos indirectos que ocasionan (Jongejan y Uilenberg 1994). De forma global, se estima que el 80 % del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas, y esto provoca pérdidas de 2,000 a 3,000 millones de dólares anuales. De hecho, hay regiones del mundo donde la industria ganadera no ha podido establecerse debido al problema de las garrapatas y las enfermedades asociadas (FAO, 1983).

La estrategia más utilizada durante muchos años para el control de la garrapata *R. microplus*, ha sido la aplicación de sustancias químicas sobre el cuerpo de los bovinos parasitados, a intervalos específicos. El historial del uso de acaricidas en el mundo ha incluido a los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, amidinas, endectocidas (lactonas macrocíclicas), fenilpirazolonas entre otros. Sin embargo, la emergencia de la resistencia ha constituido la más seria limitante para la utilización de estos químicos (Castellanos, 1998).

Debido a los problemas de resistencia en garrapatas, a la contaminación ambiental por el uso de ixodicidas y a los efectos de estos productos en la salud pública, el control inmunológico de garrapatas representa una alternativa promisoriosa, pues se logra inducir una respuesta tal en los animales inmunizados que permite mantener bajo control a estos ectoparásitos. Esta vía tiene como perspectiva una protección de mayor duración y está exenta de problemas de índole ambiental y efectos sobre la salud pública. El antígeno Bm86, aislado de células intestinales de garrapatas *R. microplus* (Willadsen *et al.* 1989), es el componente de la única vacuna comercial contra garrapatas existente a la fecha. Esta vacuna disminuye los parámetros reproductivos de las garrapatas, afectando con ello la progenie (de la Fuente *et al.* 2007). Sin embargo, su eficacia es variable dependiendo de las cepas o aislados geográficos. La proteína subolesin, descubierta recientemente (Almazán *et al.* 2003), está conservada en diferentes especies de garrapatas y mediante manipulación génica, con interferencia de ARN (iARN), se descubrió que la función de esta proteína es la modulación de la alimentación y reproducción de garrapatas (de la Fuente *et al.* 2006 c). Sin embargo, el efecto de la inmunización con la proteína recombinante no se ha evaluado aun. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de

investigación fue evaluar el efecto de la inmunización con subolesin recombinante sobre la infestación de garrapatas en bovinos.

II. ANTECEDENTES

1. Importancia general de las garrapatas

Las garrapatas son los ectoparásitos de mayor importancia económica mundial, por su capacidad para producir daño, su amplia distribución y la cantidad de animales que afectan (Castellanos, 1996). Estos artrópodos se caracterizan por tener apéndices articulados en el cuerpo, cubiertos por una cutícula, que contiene quitina y esclerotina, con áreas duras que forman un exoesqueleto, con conexiones flexibles de membranas entre los segmentos, que permiten su movilidad (Núñez, 1987; Parra *et al.* 1999).

Existen diferentes especies de garrapatas que son capaces de infestar desde mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Cerca del 10% de las 800 especies conocidas de garrapatas están establecidas en México, donde se han identificado 77 especies de garrapatas pertenecientes a 5 géneros de la familia Argasidae y 7 a la familia Ixodidae. El número de especies de garrapatas existentes en México, representa el 45% de América Latina, lo que refleja la gran variedad y clima adecuado para el desarrollo de éstas (Núñez, 1987; Parra *et al.* 1999).

A nivel mundial de las estimadas 1,000 millones de cabezas de ganado vacuno, entre el 70 y 80% vive en países tropicales y subtropicales en los que las garrapatas son activas durante todo el año. La pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas *R. (Boophilus)* spp. se calcula en 0.6 g/garrapata adulta/año, las pérdidas económicas atribuidas a *R. microplus* por disminución en la ganancia de peso se han estimado en 7.3 dólares/animal/año, esto ocasiona pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial. En México, el último cálculo oficial reportó que la infestación por garrapata *R. (Boophilus)* spp. provocó pérdidas por concepto de pieles de más de cuarenta y siete millones de dólares por año (Castellanos, 1998).

El efecto directo sobre la producción está dado por el daño en las pieles, pérdida de sangre y el efecto inmunosupresor de la saliva (Quiroz, 1991). Las garrapatas también producen bajas en la fertilidad del ganado, mayor tiempo de la engorda y dificultad en la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas por estos ectoparásitos. En cuanto a los daños indirectos se tiene la transmisión de hemoparásitos y de diversos agentes patógenos; como virus, bacterias, hongos. Todos estos factores pueden conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte (Rodríguez-Vivas *et al.* 2004).

2. Garrapatas de los bovinos

Las garrapatas de mayor importancia en bovinos pertenecen a la familia Ixodidae y son conocidas como garrapatas duras. En México se han identificado 13 géneros con más de 70 especies, el mayor impacto para la ganadería desde el punto de vista económico se debe a los géneros *R. (Boophilus) spp.* y *Amblyomma spp.*

La garrapata *R. microplus* tiene un ciclo parasítico breve sobre los bovinos. Este se inicia con la fijación de larvas de garrapatas que se desarrollan hasta ninfas que, a su vez, mudan a adultos machos y hembras. Una vez fecundadas, las hembras repletas de sangre se desprenden del bovino. Este ciclo parasítico dura alrededor de 22 días, una vez en el suelo, la hembra repleta se refugia para colocar una sola masa de huevos que darán lugar a una nueva generación de larvas. La presencia de garrapatas en un área determinada requiere de inviernos benignos (la mayoría de los meses del año con temperaturas promedio superior a 14,5° C) y su abundancia está asociada a climas relativamente húmedos que garantizan el mayor éxito en la oviposición de las hembras y la eclosión de larvas (Quiroz, 2005).

3. Enfermedades transmitidas por garrapatas

Las enfermedades más importantes y que frecuentemente son transmitidas por garrapatas a los bovinos son babesiosis y anaplasmosis (Quiroz, 2005). La babesiosis, denominada también piroplasmosis, tristeza bovina, fiebre de garrapatas y hemoglobinuria

infecciosa, es causada por hemoparásitos del género *Babesia* spp., los cuales se localizan en el interior de los glóbulos rojos donde se multiplican. Existen dos especies dominantes del género *Babesia* spp. que afectan al ganado bovino en México que son *B. bigemina* y *B. bovis* (Figuroa y Álvarez, 2007). La transmisión de la babesiosis entre los bovinos se produce a causa de la picadura de las garrapatas de un solo hospedador como *R. microplus* y *R. annulatus*. Las babesias se multiplican en el ovario de la garrapata desde donde infectan a la siguiente generación de larvas, fenómeno que se denomina transmisión transovárica. Este proceso hace posible la transmisión de parásitos de un hospedador a otro (Bowman *et al.* 2004).

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa no contagiosa producida por la rickettsia *Anaplasma marginale*. Una vez en el animal, la rickettsia se multiplica durante los siguientes 15 a 45 días sin que los animales muestren signos de la enfermedad. Existen dos tipos de transmisión en esta enfermedad, puede ser en forma biológica por garrapatas infectadas de varios géneros incluyendo *Dermacentor variabilis* en Estados Unidos y se ha sugerido a *R. microplus* en México y Latinoamérica. Y la transmisión de forma mecánica por fomites contaminados y artrópodos hematófagos como garrapatas y tábanos (Rodríguez *et al.* 2007).

La parasitemia, o porcentaje de eritrocitos infectados, se inicia en forma discreta, sin presentación de fiebre, seguida de un abrupto decremento en el valor del hematocrito a consecuencia de la masiva destrucción de eritrocitos, éste período coincide con la multiplicación acelerada de la rickettsia y con la presencia de fiebre mayor de 40°C. En este momento se observan los signos clínicos de la enfermedad: debilidad, anorexia, deshidratación, pérdida de peso y disminución de la producción de leche. La destrucción de los eritrocitos puede alcanzar del 50 al 80% de su totalidad, en estos casos el pronóstico es desfavorable. Los animales que sobreviven tardan varios meses y en ocasiones no recuperan sus condiciones iniciales de peso y de producción (Blood, 1992).

La anaplasmosis se presenta mayormente en bovinos adultos, los animales menores a 18 meses son relativamente resistentes a la enfermedad. En un área enzoótica, la mayoría de los becerros quedan infectados entre las 4 y las 24 semanas de vida. Todas las razas de bovinos son igualmente susceptibles a la infección (Rodríguez *et al.* 2007).

4. Importancia económica

Globalmente las garrapatas son un problema tanto por las enfermedades que transmiten como por las pérdidas económicas que generan y por el impacto ambiental producido por los residuos de los químicos empleados en su control. Vega (1991) reportó pérdidas económicas por anaplasmosis y babesiosis bovina en México por 48 millones de dólares anuales. Se estima que el 80% del ganado en el mundo está infestado con garrapatas causando altísimas pérdidas económicas; debido a ello se ha difundido el uso de garrapaticidas químicos como el método más común para su control debido a su efectividad contra las garrapatas que están sobre los animales, más no contra las larvas que se encuentran en el medio, obligando a realizar tratamientos continuos, acentuando la residualidad y selección de poblaciones de garrapatas resistentes hasta hacer ineficaz su uso. En México el problema de resistencia en garrapatas amenaza seriamente la exportación de ganado bovino a los Estados Unidos, ya que es una actividad rentable para los ganaderos que genera divisas por el orden de los 500 a 700 millones de dólares anuales (González-Sáenz, 2009).

5. Distribución geográfica

La distribución de las garrapatas *R. (Boophilus) spp.* se atribuye al traslado de los hospederos. Se localizan en el trópico y subtropico, en las regiones húmedas de México, Oeste de la India, América Central, Sudamérica, África, Oceanía y Asia (Camino, 1981).

Las garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus*, se encuentran de manera simultánea en la región centro sur de nuestro país. *R. microplus* se encuentra con mayor frecuencia y abundancia en las zonas tropicales y subtropicales principalmente en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán donde coexiste con *Amblyomma cajennense*; mientras *R. annulatus* que soporta menor temperatura y humedad se localiza en la parte norte del país principalmente en el norte de Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Baja California, Durango y Jalisco (SENASICA, 1995).

La situación geográfica de la Campaña Nacional contra la garrapata *R. (Boophilus)* spp. está referida a cada una de las fases del programa, la Fase Libre que ocupa una porción importante del norte del país, así como pequeñas áreas del centro, comprende 94.4 millones de hectáreas que equivalen al 47.88% del territorio nacional. Las áreas en Fase de Control en este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país. Las áreas en Erradicación cuentan con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la Campaña y representa un 0.57% (SENASICA, 1995). (www.senasica.gob.mx) (Figura 1).



Figura 1. Situación actual de la campaña contra de la garrapata *R. (Boophilus)* spp.

6. Control

El control de garrapatas *R. (Boophilus)* spp. es difícil, ya que los programas de control utilizados periódicamente no pueden sincronizarse con las fases de los ciclos evolutivos. Es por esto que siempre existen posibilidades de reinfestación, y su

erradicación se vuelve muy complicada (Delabra *et al.* 1996; Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

En el área ganadera con mayor incidencia de *R. microplus*, el control se basa en el uso de acaricidas químicos por medio de baños de inmersión y aspersion, métodos ampliamente utilizados (Quiroz, 1991).

El control químico a pesar de ser actualmente el método más utilizado es poco eficaz y costoso, puede causar daños al medio ambiente y a la salud pública a través de la contaminación de los ríos y el suelo. El uso de estos químicos se remonta desde 1895 cuando se empezaron a utilizar los compuestos arsenicales, posteriormente siguieron los carbamatos, los organoclorados, los organofosforados, los piretroides y las formamidinas (Sutherst *et al.* 1983).

En la actualidad, se tienen otros acaricidas alternativos a los tradicionales. Algunos son de aplicación tópica como el fluazuron y el fipronil; otros inyectables como las lactonas macrocíclicas. Esto amplía la capacidad de control de las garrapatas pero un aspecto importante de estos productos es que la mayoría no deben aplicarse en vacas lecheras y los períodos de restricción para el consumo de carne de los bovinos tratados con estos productos es prolongado, por lo tanto su aplicación en bovinos próximos a ser sacrificados no es posible (Benavides *et al.* 2000).

7. Resistencia a ixodicidas

La selección de la resistencia a acaricidas ha estado ocurriendo en México en las poblaciones de *R. microplus*, desde hace muchos años. La frecuencia y magnitud de la resistencia es más alta en las regiones costeras tropicales que en el interior de la República. Esta distribución de la resistencia es probablemente debida al número de tratamientos con acaricidas por año que se requieren para el control de garrapatas dentro de cada área geográfica (Miller *et al.* 2007).

Este fenómeno, se desarrolla cuando las mutaciones genéticas naturales permiten a una pequeña proporción de la población (alrededor de 1 en 1 000 000 de individuos) resistir y sobrevivir a los efectos de los productos químicos empleados como ixodicidas (Roush, 1993). Es importante considerar la resistencia como un problema de población más que de individuos, ya que en una población normal de artrópodos que no ha sido expuesta a algún ixodicida, se pueden encontrar tres tipos de individuos: homocigotos susceptibles, heterocigotos susceptible-resistentes y homocigotos resistentes (Conway y Comins, 1979).

La resistencia a los ixodicidas es una condición genética que le confiere a una población de garrapatas, la capacidad para adaptarse exitosamente a un ambiente tóxico que le permite sobrevivir a la exposición de los ixodicidas que matan a otros individuos de la misma población (Rosario-Cruz *et al.* 2009).

El primer reporte de resistencia en garrapatas *R. microplus* en México se realizó en mayo de 1981, en una muestra del municipio de Tuxpan, Veracruz que presentó resistencia a los organofosforados. Posteriormente en agosto de 1993 se detectaron los primeros hallazgos de resistencia a productos piretroides, en Soto la Marina, Tamaulipas y Emiliano Zapata, Tabasco (Ortíz *et al.* 1994). A principios del año 2001 se detectó el primer caso de resistencia a amitraz en garrapatas *R. microplus* en el estado de Tabasco. (Fragoso y Soberanes, 2001).

La resistencia múltiple a los ixodicidas en el territorio mexicano continúa extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido mediante el empleo de ixodicidas durante los últimos años y actualmente se han diagnosticado poblaciones de garrapatas resistentes a organofosforados, piretroides, amidinas (Rosario-Cruz *et al.* 2009), fipronil (Miller *et al.* 2008) y recientemente a las ivermectinas (Perez-Cogollo *et al.* 2010).

8. Control inmunológico

El incremento del problema de la resistencia a ixodicidas ha propiciado que el control químico sea cada vez más complicado y costoso. Lo anterior ha motivado el interés por el

desarrollo de vacunas contra garrapatas como una alternativa para evitar la parasitación de este artrópodo y a la vez bloquear la transmisión de enfermedades que estos parásitos transmiten a sus hospedadores (Cobon y Willadsen, 1990).

El control inmunológico de garrapatas representa una alternativa promisorio, pues con ello se logra inducir una respuesta tal en los animales inmunizados que permite mantener bajo control a estos ectoparásitos. Esta vía tiene como perspectiva una protección de mayor duración y está exenta de problemas de índole ambiental. En la búsqueda de antígenos protectores contra infestaciones por garrapatas se han identificado varias proteínas de interés, sin embargo, a la fecha existe un número reducido de proteínas que se han probado en ensayos controlados para probar su eficacia en la protección contra infestaciones controladas (de la Fuente y Kocan, 2003).

En el desarrollo de vacunas contra garrapatas se utilizan dos estrategias, el uso de antígenos expuestos y antígenos ocultos. Los antígenos expuestos son aquellos expuestos naturalmente al sistema inmune del hospedador durante la infestación. Estos antígenos son secretados en la saliva durante la alimentación de garrapatas sobre el hospedador y han demostrado que reducen pero no previenen la infestación después de repetidas infestaciones (Labuda *et al.* 2006). Los antígenos ocultos son aquellos no expuestos al sistema inmune del hospedador, se localizan en la pared del intestino de garrapatas y son inmunogénicos cuando son preparados como extractos crudos de tejidos o como proteínas recombinantes e inoculados a los animales (Nuttall *et al.* 2006).

8.1 Antígeno Bm86

A mediados de los 80s, se identificó el antígeno Bm86 en las células intestinales de garrapatas *R. microplus* (Willadsen *et al.* 1988). El antígeno Bm86 fue clonado y expresado en *Escherichia coli* y llevado a escala comercial en Australia con el nombre de TickGard® (Rand *et al.* 1989). Posteriormente este antígeno fue obtenido de la cepa cubana Camcord, clonado y expresado en la levadura *Pichia pastoris* y se obtuvo mediante un procedimiento simple en forma glicosilada y particulada. Este antígeno fue

comercializado con el nombre de GAVAC® en México y Latinoamérica. (Rodríguez *et al.* 1994; Canales *et al.* 1997; García-García *et al.* 1998).

Bm86 es un antígeno oculto al sistema inmunológico del animal, es decir, no juega ningún papel en la interacción hospedero-parásito por lo que es capaz de inducir de forma natural la inmunidad del hospedador (Willadsen y Kemp, 1998). La falta de contacto entre los antígenos ocultos y el sistema inmunológico permite que los parásitos no desarrollen estrategias para escapar a la acción de una respuesta contra ellos, esto los hace especialmente atractivos para el diseño de vacunas contra ectoparásitos (Rodríguez, 2000). Las diferentes formas en las que el sistema inmunológico del bovino puede actuar contra las garrapatas cuando se ha utilizado Bm86 como antígeno se basa en tres etapas fundamentales que son: unión de las inmunoglobulinas a las células digestivas o células blanco, fijación del complemento produciendo lisis celular y aumentando la opsonización de los anticuerpos permitiendo el ataque por fagocitos y finalmente la inhibición de la endocitosis como consecuencia de la unión de los anticuerpos (Rivera, 1996).

Cuando sucesivas generaciones de garrapatas se alimentan sobre animales inmunizados, este efecto es acumulativo y por lo tanto se logra una reducción progresiva de las poblaciones del ectoparásito en los potreros, lo cual redundará en ahorro por concepto de acaricidas y mano de obra, reducción de los problemas asociados al manejo de los productos químicos como la contaminación ambiental, disminución de la resistencia y reducción de la morbilidad por hemoparásitos. Este último efecto positivo está basado en que el programa no tiende a la erradicación, sino al control, y a mantener cierto número de garrapatas sobre los animales favoreciendo con ellos el establecimiento de la estabilidad enzoótica para los hemoparásitos (Rivera, 1996).

El antígeno Bm86 es actualmente la única vacuna comercial existente en varios países de Latinoamérica para el control de la garrapata *R. microplus* en el ganado bovino bajo el nombre de GAVAC® (Valdés *et al.* 2005). El esquema de aplicación involucra una inmunización en las semanas 0, 4 y 7, con revacunaciones cada 6 meses. Cada dosis vacunal está constituida por 100 µg de antígeno en un volumen de 2 ml (Vargas *et al.* 2005).

Aunque en la actualidad, GAVAC® sigue en el mercado como la única vacuna existente contra garrapatas, su uso ha tenido limitaciones debido a la variación en la eficacia y al hecho de que no actúa de la misma manera que los ixodicidas, los cuales fundamentalmente eliminan el estadio del parásito que está sobre el animal en el momento del tratamiento (de la Fuente y Kocan, 2006).

8.2 Antígeno Subolesin

El antígeno 4D8, posteriormente llamado subolesin fue descubierto en un modelo de infestación en ratones mediante la inmunización con una biblioteca de ADN complementario (ADNc) de garrapatas *Ixodes scapularis* (Almazán *et al.* 2005 a). Este antígeno se expresa en todas las fases de desarrollo de garrapatas de la familia Ixodidae, por lo que se considera un antígeno altamente conservado (Almazán *et al.* 2003). Posteriormente, el hallazgo de subolesin fue confirmado mediante el tamizado de iARN en *I. scapularis* y la función de este gen fue confirmada por estudios de iARN en diferentes especies de garrapatas como *I. scapularis*, *Amblyomma americanum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *D. marginatus* (de la Fuente *et al.* 2005), donde se observó que el silenciamiento de este gen produce degeneración de intestinos, glándulas salivales y sistema reproductor de hembras y machos tratados con ARNdc. Estos estudios demostraron el papel de subolesin en la modulación de la alimentación y reproducción de las garrapatas, ocasionando una reducción en la progenie (de la Fuente *et al.* 2006 c).

La proteína recombinante subolesin de origen *I. scapularis* fue expresada y caracterizada en *Escherichia coli*, purificada por cromatografía de afinidad y utilizada para estudios de inmunización de ratones y conejos que fueron sometidos posteriormente a la infestación por larvas y ninfas de *I. scapularis*, *A. americanun* y *D. variabilis*. El porcentaje de efectividad obtenido fue mayor al 50% contra las diferentes especies de garrapatas (Almazán *et al.* 2005 b).

En un ensayo realizado para evaluar el efecto de subolesin sobre la infestación de *I. scapularis* adultas en ovinos, se obtuvo un 58% de reducción en la alimentación. La oviposición se redujo de 22-49% y la eficacia general de la vacunación fue del 92% (Almazán *et al.* 2005 b).

La inmunización con la proteína recombinante demostró protección contra las infestaciones por garrapatas, reduciendo la supervivencia de hembras adultas y ocasionando degeneración de los tejidos del intestino y de las glándulas salivales (de la Fuente *et al.* 2006 c).

Para determinar si subolesin interfería con la capacidad de las garrapatas de infectarse con los patógenos *A. marginale* (agente causal de anaplasmosis) y *A. phagocytophilum* (agente causal de anaplasmosis granulocítica), se utilizaron machos de *D. variabilis* los cuales fueron inyectados con ARNdc de subolesin y se alimentaron sobre bovinos infectados con *A. marginale*. En cuanto a *A. phagocytophilum* los estudios se hicieron en ratones inmunizados con la proteína recombinante subolesin, después fueron infectados con *A. phagocytophilum* e infestados con *I. scapularis*. Las infecciones de las garrapatas fueron determinadas por PCR cuantitativa en intestino y glándulas salivales. En ambos experimentos las infecciones en garrapatas se redujeron significativamente. Con estos resultados se propuso a subolesin como candidato a antígeno vacunal que podría contribuir a controlar múltiples especies de garrapatas y la reducción de agentes patógenos (de la Fuente *et al.* 2006 b).

III. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas del ganado bovino, *R. microplus* y *R. annulatus* son consideradas actualmente las plagas que más pérdidas económicas causan a la ganadería bovina de México, tanto por su efecto hematófago como por la transmisión de enfermedades como babesiosis y anaplasmosis. Estas enfermedades representan un obstáculo en programas de mejoramiento genético en zonas con presencia de garrapatas. A pesar de los esfuerzos tendientes a establecer diferentes alternativas de control, el método de control comúnmente usado en garrapatas ha sido por mucho tiempo, el uso intensivo de ixodicidas en baños de inmersión o directamente sobre el ganado por lo que las poblaciones de garrapatas han mostrado resistencia, observándose una disminución del efecto letal de estos ixodicidas, lo que indica que las estrategias basadas en el control químico no son efectivas principalmente por la aplicación errónea de los productos. Actualmente, en México existe resistencia de garrapatas *R. microplus* a la mayoría de los

ixodíctidas, lo que hace que el control químico de estos ectoparásitos sea cada vez más limitado e incrementa el costo. Lo anterior justifica la investigación de métodos alternativos de control de garrapatas diferentes al químico. Por lo tanto, se requiere desarrollar vacunas que eviten el parasitismo por estos artrópodos y a la vez bloqueen la transmisión de enfermedades que transmiten al ganado, que sean amigables con el medio ambiente y que no contaminen los productos destinados al consumo humano como carne y leche. Con el fin de contar con métodos alternativos de control, en este trabajo de investigación se evaluó el efecto de la inmunización con la proteína recombinante subolesin sobre la infestación de garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus* en bovinos.

IV. HIPÓTESIS

Las garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus* alimentadas sobre bovinos inmunizados con subolesin disminuyen el porcentaje de repleción, peso, oviposición y fertilidad de huevos en comparación con garrapatas alimentadas sobre bovinos no inmunizados.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar el efecto de la inmunización de bovinos con subolesin recombinante sobre la infestación de garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus*

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la inmunización de bovinos con subolesin sobre la repleción, peso, oviposición y fertilidad de huevos de garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus*
- Determinar la respuesta inmune humoral en los bovinos inmunizados con subolesin recombinante y su relación con la infestación de garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus*

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Localización geográfica

El ensayo de inmunización se realizó en la posta zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (FMVZ-UAT), ubicada en el kilómetro 5.5 de la carretera Cd. Victoria – Mante. El municipio de Victoria se localiza entre los 23° 59' y los 23° 24' de latitud norte y los 98° 55' - 99° 26' de longitud oeste; atravesado por el trópico de cáncer a los 23° 27'. La temperatura promedio anual es de 24°C y una precipitación promedio anual de 912.8 mm (INEGI, 1995). Este lugar cuenta con las condiciones climatológicas idóneas para el desarrollo del ciclo biológico de garrapatas *R. (Boophilus) spp.*

6.2 Bovinos

Se utilizaron 16 bovinos hembras de 6 meses de edad con un peso promedio de 180 kg. Las hembras eran cruza de razas europeas (Limousin por Simmental). Los animales se mantuvieron en los corrales de la posta zootécnica de la FMVZ-UAT durante las inmunizaciones (Anexo 1). La alimentación consistió en una dieta de engorda a base de sorgo, soya, minerales, melaza y fibra. El agua era proporcionada a libre acceso. 30 días antes de comenzar la primera inmunización los animales fueron tratados con amitraz al 12.5% (Taktic, Intervet/Schering-Plough®) a dosis de 5 litros de solución preparada por animal, también fueron desparasitados con Albendazol al 10% adicionado con Sulfato de Cobalto (Valbovino Co, Novartis®) a dosis de 7.5 mg/kg de peso.

6.3 Protocolo de inmunización

Los bovinos fueron distribuidos en 4 grupos de 4 bovinos cada uno. El primer grupo, fue tratado con solución salina más adyuvante y fungió como testigo o control negativo. El segundo grupo fue inmunizado con subolesin recombinante (expresada en *Escherichia coli*). El tercer grupo fue inmunizado con una combinación de subolesin (50 µg) + Bm86 (50 µg) y el cuarto grupo o control positivo fue inmunizado con el antígeno Bm86. Los

animales fueron inmunizados con 3 dosis de 100 µg de proteínas recombinantes adyuvadas en Montanide (ISA50V, Sepic®) o solo adyuvante (grupo testigo) en un volumen final de 2 ml por dosis los días 0, 28 y 42. La inmunización se realizó por vía intramuscular profunda mediante jeringas de 5 ml con agujas de 18G (Anexo 2A y 2B).

6.4 Infestación

A los 15 días posteriores a la última inmunización los animales fueron trasladados a una unidad experimental adaptada para bovinos jóvenes donde fueron mantenidos en corraletas individuales con tapetes vinílicos. Los animales recibieron dos raciones de alimento al día y se proporcionó agua fresca varias veces al día (Anexo 3A).

Cada animal fue bañado y rasurado en la parte dorsal donde se adhirieron 2 celdas de algodón con pegamento industrial 3M (Anexo 3B). Todos los animales fueron infestados con 10,000 larvas de garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus* (Anexo 3C) en el lado izquierdo y derecho respectivamente. Las larvas que no se adhirieron fueron retiradas a las 48 horas postinfestación. Cada celda fue observada diariamente y una vez que las garrapatas completaron su repleción fueron colectadas, pesadas diariamente y depositadas en recipientes de plástico dentro de incubadoras con humedad y temperatura de 80% y 27°C respectivamente para permitir la oviposición y eclosión.

6.5 Garrapatas

Se utilizaron larvas de garrapatas *R. microplus* de una cepa susceptible a ixodicidas que fue colectada originalmente en Tapalpa, Jal., México. Esta cepa fue establecida en el laboratorio de artrópodos del Cenid-Pavet, INIFAP. Las larvas de *R. annulatus* provenían de una cepa susceptible a ixodicidas colectada en Mission, Texas y establecida en el laboratorio de investigación en garrapatas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Ambas cepas se han mantenido en el laboratorio de parasitología de la FMVZ-UAT, durante tres años aproximadamente a través de la alimentación en bovinos. Las larvas, al momento de la infestación tenían 15 días de edad.

6.6 Determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal en tubos de 10 ml de todos los animales los días 0, 28, 42, 57 y al término del experimento (día 80) (Anexo 4A). El suero se obtuvo por centrifugación a 1500 rpm (Anexo 4B) y se almacenó a -20°C (Anexo 4C). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante la prueba de ELISA indirecto de acuerdo al siguiente protocolo: Se agregó 0.1 µg/pozo de cada antígeno purificado para cubrir las placas de ELISA y se incubaron durante una noche a temperatura de 4°C. Los sueros fueron diluidos a concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) adicionada con Tween 20 al 0.5% (PBS-T 0.5%) con un pH de 7.2 y 10% de suero fetal bovino (Sigma) y las placas incubadas 1 hora a 37°C. Posteriormente las placas fueron incubadas con IgG de conejo anti-IgG de bovino acoplado a peroxidasa a una concentración 1:10,000 durante 1 hora a 37°C. Se adicionó el sustrato y la reacción de color se desarrolló con 3,3', 5,5' tetrametyl bencidina (Sigma). La reacción de color se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2 N y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro (BioRad) a 450 nm de longitud de onda.

Los títulos de anticuerpos fueron considerados positivos cuando el valor de la absorbancia fue de al menos dos veces el valor del suero preinmune. Se utilizó la dilución mayor (1:1000) para obtener los resultados de los valores de la absorbancia. Posteriormente estos resultados fueron analizados por grupo y se compararon con el grupo testigo mediante un análisis de varianza ANOVA ($p < 0.05$).

6.7 Evaluación de resultados

Los datos fueron evaluados tal como se menciona en de la Fuente *et al.* (1999) de acuerdo a las siguientes fórmulas:

- **Efecto sobre el número de hembras adultas (GA)** = $100 [1 - (NGV/NGC)]$, donde NGV es el número de garrapatas hembras adultas en el grupo vacunado y NGC es el número de garrapatas hembras adultas en el grupo testigo.

- **Efecto sobre el peso de hembras repletas (PG)** = $100 [1-(PGV/PGC)]$, donde PGV es el promedio del peso de hembras adultas en el grupo vacunado y PGC es el promedio del peso de hembras adultas en el grupo testigo.
- **Efecto sobre la oviposición (PO)** = $100 [1-(POGV/POGC)]$, donde POGV es el promedio del peso de la masa de huevos en el grupo vacunado y POGC es el promedio del peso de la masa de huevos del grupo testigo.
- **Efecto sobre la fertilidad (EF)** = $100 [1-(PPLOV/PPLOC)]$, donde PPLOV es el promedio del peso de larvas por gramo de huevos en el grupo vacunado y PPLOC es el promedio del peso de larvas por gramo de huevos en el grupo testigo.
- **Eficacia de la vacunación (E)** = $100 [1-(CRG \times CR0 \times CRF)]$, donde CRG = NGV/NGC, CR0 = POGV/POGC y CRF = PPLOV/PPLOC, representan la reducción del número de garrapatas hembras adultas, reducción de la oviposición y reducción de la fertilidad de huevos comparada con el grupo testigo respectivamente.

6.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando la prueba de *t-student* para varianzas desiguales ($p < 0.05$) para comparar los resultados del número de garrapatas hembras adultas, el peso de las garrapatas, la oviposición y la fertilidad de huevos entre los grupos vacunados y el grupo testigo respectivamente.

Para comparar los resultados de la determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto se realizó un ANOVA ($p < 0.05$) para comparaciones múltiples entre los grupos vacunados y el grupo testigo respectivamente. Ambas pruebas se corrieron con el programa Microsoft Excel.

VII. RESULTADOS

7.1 Efecto de la vacunación sobre *R. microplus*

De acuerdo con los porcentajes de reducción de *R. microplus* obtenidos para cada grupo después de las inmunizaciones se puede notar que los resultados difieren entre grupos (cuadro 1). Los bovinos del grupo Bm86 mostraron un mayor porcentaje de reducción sobre el efecto del número de hembras adultas con un 51% ($p<0.05$) a diferencia del grupo de subolesin y la combinación subolesin + Bm86 cuyos porcentajes fueron menores: 43% ($p<0.05$) y 12% respectivamente. Para el caso del efecto sobre el peso de hembras repletas, el grupo de la combinación subolesin + Bm86 fue el que tuvo un mejor porcentaje de reducción con un 12% ($p<0.05$) en comparación con el grupo de subolesin que presentó 0% de reducción y un 5 % para el grupo inmunizado con Bm86.

En lo que corresponde al efecto sobre la oviposición destaca también el grupo de la combinación subolesin + Bm86 con 17% de reducción seguido del grupo Bm86 con 14% pero sin ningún efecto en el grupo subolesin.

En el efecto sobre la fertilidad de huevos, el grupo que tuvo un mayor porcentaje de reducción fue el de subolesin con 15% a diferencia de un 6% y un 8% que corresponden al grupo de Bm86 y la combinación subolesin + Bm86.

Con los resultados obtenidos en los diferentes parámetros evaluados, se obtuvo un resultado final que corresponde a la eficacia total de cada vacunación, para ello se utilizó la fórmula descrita anteriormente, donde se observó que la vacunación realizada con Bm86 presentó un 60% de eficacia, lo que indica una reducción de garrapatas *R. microplus*. Para el caso de la vacunación con subolesin se obtuvo un 51% de eficacia y para la combinación subolesin + Bm86 la eficacia final fue de 23%.

Cuadro 1. Porcentajes de reducción (vacunado/testigo) de *R. microplus* en bovinos

GRUPO	GA	PG	PO	EF	E
Subolesin	43% (835±179)**	0% (277±33)	0% (107±21)	15% (0.44±0.06)	51%
Subolesin + Bm86	12% (1285±184)	12% (243±22)**	17% (87±16)	8% (0.56%±0.05)	23%
Bm86	51% (714±208)**	5% (261±26)	14% (92±16)	6% (0.49±0.04)	60%
Testigo	(1454±206)	(276±14)	(107±12)	(0.52±0.29)	--

El porcentaje de reducción fue calculado con respecto al grupo testigo: GA, efecto sobre el número de hembras adultas; PG, efecto sobre el peso de hembras repletas; PO, efecto sobre la oviposición; EF, efecto sobre la fertilidad; E, eficacia de la vacunación. En paréntesis se muestra la media ± la desviación estándar por número de hembras adultas, peso, oviposición y fertilidad.

*** Señala diferencias significativas, según prueba de t-student ($p < 0.05$).*

7.2 Efecto de la vacunación sobre *R. annulatus*

Los resultados obtenidos en cuanto al efecto de la vacunación para la reducción de garrapatas *R. annulatus* fueron mayores que los obtenidos para *R. microplus*.

En el Cuadro 2 se observan los resultados en los diferentes grupos. Se puede ver que el grupo inmunizado con Bm86 tuvo el mejor porcentaje de reducción para todos los parámetros evaluados, con una eficacia general de la vacunación de 100%.

En el grupo inmunizado con subolesin se observó un 18% de reducción sobre el efecto del número de hembras adultas a diferencia de un 26% del grupo de la combinación subolesin + Bm86, estadísticamente diferente respecto al grupo control ($p < 0.05$). Para el efecto sobre el peso de hembras repletas hubo una marcada diferencia

en cuanto a dos de los grupos, el grupo de subolesin presentó 17% y el grupo de la combinación subolesin + Bm86 presentó solo un 8%.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo en el efecto sobre la oviposición, estos fueron similares para ambos grupos, subolesin con 23% y la combinación subolesin + Bm86 con 20%. Con respecto al efecto sobre la fertilidad de huevos los resultados para subolesin y la combinación subolesin + Bm86 fueron de 37% y 26% respectivamente.

Tal como puede verse, la eficacia de la vacunación con Bm86 sobre *R. annulatus* fue del 100% en comparación con el grupo subolesin que tuvo una eficacia de 60% y del grupo de la combinación subolesin + Bm86 con un 56% de eficacia.

Cuadro 2. Porcentajes de reducción (vacunado/testigo) de *R. annulatus* en bovinos

GRUPO	GA	PG	PO	EF	E
Subolesin	18% (419±288)	17% (192±129)	23% (69±49)	37% (0.09±0.07)	60%
Subolesin + Bm86	26% (374±284)**	8% (212±28)	20% (72±21)	26% (0.11±0.05)	56%
Bm86	100% (0±0)**	100% (0±0)**	100% (0±0)**	100% (0±0)**	100%
Testigo	(509±145)	(231±28)	(90±20)	(0.15±0.03)	--

El porcentaje de reducción fue calculado con respecto al grupo testigo: GA, efecto sobre el número de hembras adultas; PG, efecto sobre el peso de hembras repletas; PO, efecto sobre la oviposición; EF, efecto sobre la fertilidad; E, eficacia de la vacunación. En paréntesis se muestra la media ± la desviación estándar por número de hembras adultas, peso, oviposición y fertilidad.

*** Señala diferencias significativas, según prueba de t-student (p<0.05).*

7.3 Respuesta de anticuerpos en los bovinos inmunizados

Los resultados del título de anticuerpos utilizando la prueba de ELISA indirecto para cada uno de los grupos se muestra en el Cuadro 3, donde se observan las absorbancias obtenidas en la dilución 1:1000.

Al principio del experimento los valores de absorbancia fueron similares para los cuatro grupos. Posteriormente se muestra un ligero incremento en dos de los grupos después de la primera inmunización que corresponde al grupo inmunizado con Bm86 y al grupo inmunizado con subolesin siendo ambos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Después de la segunda y tercera inmunización, el único grupo que presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) fue el grupo inmunizado con Bm86, cuyos valores son mayores en comparación a los grupos inmunizados con subolesin y con la combinación subolesin + Bm86.

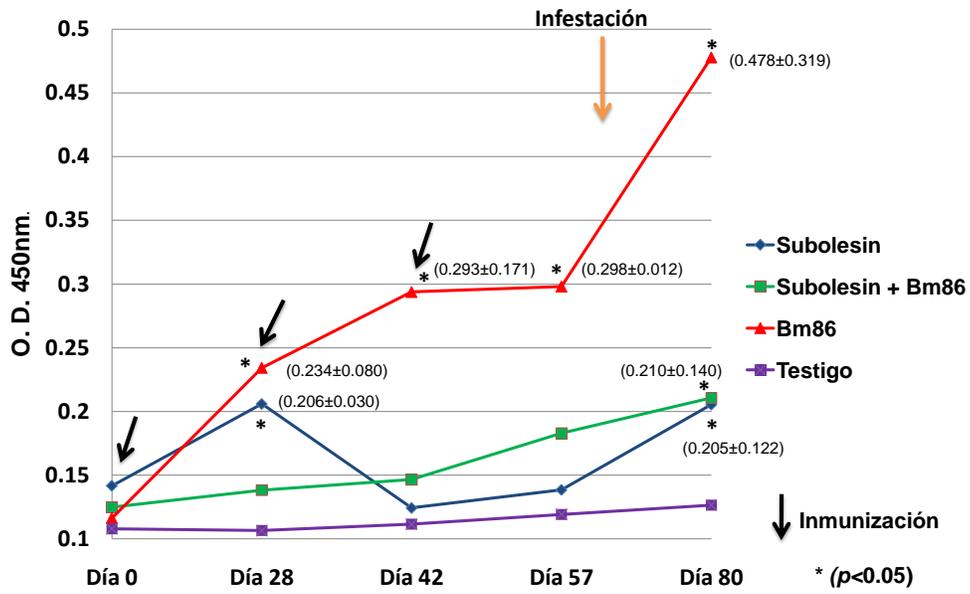
Para el final del experimento los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos ($p < 0.05$), siendo el grupo inmunizado con Bm86 el que tuvo el valor de absorbancia mas alto.

En la Figura 2 se muestra la grafica de la curva del título de anticuerpos obtenido durante el experimento.

Cuadro 3. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos en el ELISA indirecto durante el experimento de inmunización en bovinos utilizando la dilución 1:1000

Grupo	Bovino	Día 0	Día 28	Día 42	Día 57	Día 80
Subolesin	1	0.137	0.178	0.109	0.113	0.157
	2	0.138	0.195	0.122	0.131	0.14
	3	0.128	0.201	0.117	0.11	0.136
	4	0.164	0.25	0.149	0.2	0.389
Promedio		0.141	0.206	0.124	0.138	0.205
Desv. Estandar		0.015	0.030	0.017	0.042	0.122
Combinación/Ag Sub	1	0.143	0.129	0.175	0.259	0.151
	2	0.151	0.14	0.133	0.19	0.143
	3	0.15	0.148	0.145	0.141	0.231
	4	0.15	0.152	0.162	0.171	0.64
Promedio		0.148	0.142	0.153	0.190	0.291
Desv. Estandar		0.003	0.010	0.018	0.050	0.235
Combinación/Ag Bm86	1	0.06	0.136	0.087	0.22	0.111
	2	0.078	0.13	0.209	0.121	0.114
	3	0.108	0.13	0.13	0.2	0.097
	4	0.159	0.141	0.131	0.161	0.198
Promedio		0.101	0.134	0.139	0.175	0.13
Desv. Estandar		0.043	0.005	0.050	0.043	0.045
Bm86	1	0.06	0.3	0.5	0.308	0.9
	2	0.074	0.137	0.295	0.28	0.503
	3	0.274	0.3	0.08	0.304	0.374
	4	0.057	0.2	0.3	0.3	0.135
Promedio		0.116	0.234	0.293	0.298	0.478
Desv. Estandar		0.105	0.080	0.171	0.012	0.319
Testigo	1	0.11	0.125	0.165	0.148	0.142
	2	0.102	0.121	0.118	0.121	0.116
	3	0.115	0.087	0.068	0.102	0.119
	4	0.105	0.093	0.095	0.106	0.129
Promedio		0.108	0.106	0.111	0.119	0.126
Desv. Estandar		0.005	0.019	0.041	0.020	0.011

Figura 2. Título de anticuerpos en los grupos de bovinos inmunizados



En la gráfica se observa el promedio del título de anticuerpos para cada grupo obtenido a 450 nm de longitud de onda. Los valores obtenidos por grupo fueron analizados y comparados con el grupo testigo mediante ANOVA $^*(p < 0.05)$. Las flechas negras indican las inmunizaciones y la flecha naranja la infestación.

VIII. DISCUSIÓN

El control inmunológico de garrapatas por medio de la inmunización de los hospederos con antígenos obtenidos a partir del intestino de garrapatas se demostró en el género *R. (Boophilus)* spp. Los ejemplos más claros de antígenos utilizados en vacunas para el control de garrapatas son Bm86 y posteriormente Bm95 (Willadsen y Kemp, 1998; de la Fuente *et al.* 2000 a; García-García *et al.* 2000).

Este es el primer trabajo de investigación que evalúa la capacidad de subolesin para controlar infestaciones por garrapatas mediante inmunización en bovinos. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, los dos antígenos y la combinación de ambos muestran un efecto sobre la reducción de la infestación de *R. microplus* y de *R. annulatus*, lo que significa que a) los animales vacunados desarrollaron anticuerpos contra los antígenos y b) como consecuencia existió reducción de la sobrevivencia del artrópodo, disminución del peso y de la fertilidad de huevos en comparación con el grupo testigo. Estos datos concuerdan con estudios anteriores, (Fragoso *et al.* 1998, de la Fuente *et al.* 1998 y Canales *et al.* 2009) donde se demostró que el uso de las vacunas son económicamente viables y efectivas para el control de las garrapatas del bovino, con una reducción en el uso de acaricidas y alcanzando hasta un 99% de eficacia.

En este estudio, se pudo apreciar que la respuesta de anticuerpos en los animales inmunizados con subolesin no incrementó después de sucesivas inmunizaciones, solo después de la primera inmunización para disminuir después de la segunda. La explicación a esto no es clara, pero pudo deberse a diversas causas como la naturaleza propia de la proteína, o la propia formulación de la vacuna. En cuanto a la combinación subolesin + Bm86 la curva de anticuerpos fue atípica y nunca mostró un incremento considerable conforme se realizaron las inmunizaciones. Lo anterior puede deberse a la baja respuesta inmune producida por subolesin y a que al combinar dos antígenos no se tiene con certeza si van a mostrar sinergia o antagonismo. Al respecto, se ha sugerido que la combinación de dos antígenos podría incrementar la eficacia de las vacunas, sin embargo, existen muchos factores que afectan la inmunogenicidad y los resultados pueden no ser favorables (Willadsen, 2009). En este ensayo, se hizo la combinación de ambos antígenos en una preparación final de 100 µg de proteína recombinante (subolesin 50 µg + Bm86 50 µg), por lo que no se obtuvo una respuesta inmune suficiente para cada

proteína. Y como consecuencia la eficacia en la reducción de la infestación observada fue muy baja.

La curva de anticuerpos en el grupo inmunizado con Bm86 mostró una respuesta típica, es decir incrementó conforme se realizaron las inmunizaciones. Lo anterior sugiere que la cantidad de proteína utilizada fue suficiente para inducir una respuesta inmune protectora. En general el título de anticuerpos en el ganado vacunado fue bajo incluso en el grupo vacunado con Bm86 comparándolo con estudios anteriores (Canales *et al.* 2009). Lo anterior puede deberse a varios factores como el manejo de los inmunógenos, el adyuvante empleado y a la baja estimulación del sistema inmune de los animales empleados en el experimento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de vacunación con los dos diferentes antígenos y la combinación de ambos sobre los porcentajes de reducción y eficacia de la vacunación, se mostró un efecto significativo sobre las infestaciones tanto de *R. microplus* y *R. annulatus* para los tres grupos cuando fueron comparados con el grupo testigo. La eficacia general de subolesin contra *R. microplus* fue de 51% y para *R. annulatus* de 60%. Estos resultados difieren de lo obtenido en garrapatas *I. scapularis*, *A. americanum*, *D. variabilis* donde la eficacia general fue superior al 90%. (Almazán *et al.* 2005 ab; de la Fuente *et al.* 2006 c).

En el caso de la combinación subolesin + Bm86 el efecto sobre las dos especies de garrapatas fue muy bajo y se explica por el bajo título de anticuerpos obtenido en este grupo.

Estudios anteriores con Bm86 confirmaron que es posible controlar las infestaciones por garrapatas *R. (Boophilus) spp.* (Rodríguez *et al.* 2002; de la Fuente y Kocan 2003, 2006; Nuttall *et al.* 2006; Sonenshine *et al.* 2006; de la Fuente *et al.* 2006 a). En este trabajo se obtuvo una eficacia general de la vacunación con Bm86 del 60% contra *R. microplus*, estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios anteriores (Cobon *et al.* 1995; Fragoso *et al.* 1998; de la Fuente *et al.* 1998, 1999, 2000 ab; García-García *et al.* 2000; de Vos *et al.* 2001; de la Fuente y Kocan 2003, 2006; Canales *et al.* 2009), quienes encontraron disminución en la repleción, peso, oviposición y fertilidad de huevos de hembras de garrapata *R. microplus*, con una eficacia general que varía del 45% al 86%

por lo tanto lo obtenido en este estudio indica que la eficacia se encuentra dentro de los rangos reportados. En el caso de *R. annulatus* los resultados obtenidos en todos los parámetros evaluados fueron del 100% de reducción en el número de garrapatas, peso, oviposición y en fertilidad de huevos con una eficacia general de la vacunación del 100%. Esto confirma lo reportado previamente (Fragoso *et al.* 1998; de la Fuente *et al.* 2000 ab; de Vos *et al.* 2001; Canales *et al.* 2009). Por lo anterior y de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el antígeno Bm86 es a la fecha la proteína que ha mostrado los mejores resultados para el control de infestaciones por *R. (Boophilus) spp.*

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este primer ensayo de inmunización con el antígeno subolesin mostraron una eficacia general del 51% contra garrapatas *R. microplus* y 60% contra *R. annulatus*. Aun cuando se han realizado trabajos de investigación utilizando subolesin recombinante para controlar infestaciones por garrapatas en otras especies (Almazán *et al.* 2005 b), este es el primer estudio donde se evaluó la combinación de dos antígenos para el control de infestaciones por garrapata *R. (Boophilus) spp.* en bovinos. Sin embargo, se requieren más trabajos de investigación para evaluar el efecto sinérgico de estos antígenos en la respuesta inmune protectora contra la infestación y sobrevivencia de garrapatas. Los resultados obtenidos con Bm86 confirmaron la eficacia de esta proteína en el control de infestaciones por *R. (Boophilus) spp.* en bovinos. Estas vacunas recombinantes han demostrado efectividad y viabilidad económica para el control de garrapatas *R. (Boophilus) spp.*, en bovinos, estas vacunas deben incluirse como parte de un programa de control integrado en combinación con ixodicidas para disminuir las infestaciones por garrapatas y la transmisión de patógenos en bovinos.

X. REFERENCIAS

1. **Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, García-García JC, Blouin EF, de la Fuente J.** 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*; 21:1492-1501.
2. **Almazán C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, de la Fuente J.** 2005a. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine*; 23:4403–16.
3. **Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente J.** 2005b. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*; 23:5294–8.
4. **Benavides OE, Romero NA, Rodríguez BJ.** 2000. Situación actual de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. *Carta Fedegan* 61. 14-23.
5. **Blood DC.** 1992. *Medicina Veterinaria*. Séptima edición. México, Editorial Interamericana. pp. 1664-1669.
6. **Bowman DD, Randy CL, Mark LE.** 2004. *Parasitología para veterinarios*. Octava edición. Madrid, España, Editorial elsevier. pp. 55-61.
7. **Camino LM.** 1981. The development of an integrated pest management system for the cattle tick, *Boophilus microplus* in Morelos state, Mex. *Acarology*; 41:3302 – 3303.
8. **Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, Falcón V, Rodríguez M and J. de la Fuente.** 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine GavacTM against cattle tick. *Vaccine*; 15:414-422.
9. **Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J.** 2009. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology*; 9:29.
10. **Castellanos HJL.** 1996. El género *Boophilus*. Manual de acreditación técnica para la aprobación de Médicos Veterinarios como unidades de verificación en la Campaña Contra la Garrapata. Tomo I. FEDMVZ: México. pp. 36-51.
11. **Castellanos HJL.** 1998. Seguimiento a predios con garrapata resistente hacia los ixodicidas y alternativas para su control. Curso de diagnóstico y control de las principales enfermedades parasitarias. FMVZ-UAT. Ciudad Victoria, Tam. México. pp. 51-54.
12. **Cobon G, Willadsen P.** 1990. Vaccines to prevent cattle tick infestations. *Vaccine*; 50:901-17.
13. **Cobon G, Hungerford J, Woodrow M, Smith D, Willadsen P.** 1995. Vaccination against *Boophilus microplus*. The Australian field experience. In: de la Fuente J (ed) *Recombinant vaccines for the control of cattle tick*. Elfos Scientiae, La Habana, Cuba, pp. 163–176.
14. **Conway GR, Comins HN.** 1979. Resistance to pesticides: Lessons in strategy from mathematical models. *Span*; 2: 53-55.
15. **Cordero del Campillo FA, Rojo V.** 1999. *Parasitología veterinaria*. Primera edición. Madrid. España. Editorial Mc.Graw Hill. pp. 420-429.

16. **Delabra VG, Frago SH, Franco BR, Martínez IF, Ortiz EM, Ortiz NA, Osorio MJ, Santamaría VM, Soberanes CN.** 1996. Manual de identificación de las especies de garrapatas de importancia en México. Jiutepec. Mor. México. pp. 4-7.
17. **de la Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, García-García JC, Méndez L, Serrano E, Valdés M, Enríquez A, Canales M, Ramos E, de Armas CA, Rey S, Rodríguez JL, Artilés M, García L.** 1998. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*; 16:366–373.
18. **de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, Serrano E, Valdés M, Enríquez A, Canales M, Ramos E, Boué O, Machado H, Leonart R.** 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. *Gen Anal Biomol Eng*; 15:143–148.
19. **de la Fuente J, Rodríguez M, García-García JC.** 2000a. Immunological controls of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann New York Acad Sci*; 916: 617-621.
20. **de la Fuente J, García-García JC, González DM, Izquierdo G, Ochagavia ME.** 2000b. Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. *Vet Parasitol*; 92:209–222
21. **de la Fuente J, Kocan KM.** 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines*; 2:583–93.
22. **de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM.** 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res*; 96:137–141.
23. **de la Fuente J, Kocan KM.** 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol*; 28: 275-283.
24. **de la Fuente J, Canales M, Kocan KM.** 2006a. The importance of protein glycosylation in development of novel tick vaccine strategies. *Parasite Immunol*; 28: 687-688.
25. **de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM.** 2006b. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitol Res*; 100:85-91.
26. **de la Fuente J, Almazán C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, Gortazar C, Kocan KM.** 2006c. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood digestion and reproduction. *Vaccine*; 24:4082–4095.
27. **de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P.** 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev*; 8:23-28.
28. **de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F.** 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol*; 25:245–261.
29. **Figueroa MJV, Álvarez MJA.** 2007. Vacunas contra babesiosis bovina: Actualidad y perspectiva. Simposium internacional: garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. FMVZ-UAT. Cd Victoria, Tam. México. pp. 82-92.

30. **Fragoso SH, Hoshmand RP, Ortiz EM, Rodríguez M, Redondo M, Herrera L, de la Fuente J.** 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine*; 16:1990–1992.
31. **Fragoso SH, Soberanes CN.** 2001. Control de la resistencia a los ixodícidias a la luz de los conocimientos actuales. XXV Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Ver. México. pp. 40-48.
32. **FAO.** 1987. Control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo. Volumen I. FAO.
33. **FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER 36.** 1983. Ticks and tick-borne diseases. Selected articles from the world animal review. Número 16.
34. **García-García JC, Montero C, Rodríguez M, Soto A, Redondo M, Valdés M, Méndez L, de la Fuente J.** 1998. Effect of particulation on the immunogenic and protective properties of the recombinant Bm86 antigen expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*; 16: 374-380.
35. **García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boué O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González I, Valdés M, Méndez L, de la Fuente J.** 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*; 18:2275-2287.
36. **García CM.** 2003. Perspectivas de la Ganadería Tropical de México ante la Globalización. Conferencia Magistral: XXVII Congreso Nacional de Buiatría. Villahermosa, Tab. México. pp. 172-182.
37. **González-Sáenz JR.** 2009. Importancia de la garrapata *Boophilus* en la exportación de ganado. Simposium internacional: garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. FMVZ-UAT. Cd Victoria, Tam. México. pp. 30-34.
38. **INEGI.** 1995. Anuario estadístico del estado de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tam: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, Gobierno del estado de Tamaulipas.
39. **Jongejan F, Uilenberg G.** 1994. Ticks and control methods. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*; 13: 1201-1226.
40. **Labuda M, Trimnell AR, Lickova M, Kazimirova M, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA.** 2006. An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog*; 2: 251-259.
41. **Miller RJ, Davey RB, White WH, George JE.** 2007. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus*. *J Med Entomol*; 2: 283-294.
42. **Miller RJ, Almazán GC, Ortíz EM, Davey RB, George JE.** 2008. A survey for fipronil-and-ivermectin-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal. Boca del Río, Ver. México.
43. **Murrell A, Barker SC.** 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol*; 56:169-172.
44. **Núñez JL.** 1987. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Primera edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur. pp. 34-40.

45. **Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M.** 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and ticks-borne diseases. *Parasite Immunol*; 28:155-163.
46. **Ortíz EM, Santamaria VM, Fragoso SH.** 1994. Resistencia en garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en México. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México.
47. **Parra MH, Peláez SL, Segura CF, Arcos JC, Londoño A, Díaz E, Vanegas MA.** 1999. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Manual para la capacitación en tecnologías agropecuarias; 2:72-77.
48. **Perez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ.** 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol*; 168:165-169.
49. **Quiroz RH.** 1991. Situación actual de la problemática de las garrapatas. II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. pp. 3-7.
50. **Quiroz RH.** 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Primera edición. México, DF. Editorial Limusa. pp. 796-802.
51. **Rand KN, Sirikantha A, Spring K, Tellan R, Willadsen P, Cobon G.** 1989. Cloning and expression of a protective antigen from cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Nac Acad Sci*; 86:9657-9661.
52. **Rivera M.** 1996. Hemoparasitosis Bovinos. Anauco ediciones, C.A. Caracas, Venezuela. pp. 131-46.
53. **Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, Sánchez G, Bringas R, Cordovés C, Valdés M, Leonart R, Herrera L, de la Fuente J.** 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol*; 33: 135-146.
54. **Rodríguez M.** 2000. Respuesta inmunológica contra garrapatas. *Biotecnología aplicada*. 17:215-220.
55. **Rodríguez M, Montero C, Redondo M, Méndez L, Valdés M, Leonart R, Pérez H, Seoane G, Vargas M, Borroto C, Serrano E, Boué O, Lodos J, Machado H.** 2002. Extensión e impacto de la vacuna Gavac en el programa de lucha contra *Boophilus microplus* en Cuba. Premio Anual de Innovación Tecnológica, Agencia de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Resolución No. 09/2002.
56. **Rodríguez SD, García OM, Rojas RE, Preciado de la Torre J, Cantó AG, Vega y Murguía C, L.E Orozco Vega G.J.** 2007. La Anaplasmosis bovina en México. *Symposium Internacional: garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. FMVZ-UAT. Cd Victoria, Tam. México.* pp. 105-116.
57. **Rodríguez-Vivas RI, Mata-Méndez Y, Pérez-Gutiérrez E, Wagner G.** 2004. The effect of management factor on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos Indicus* cattle in the Mexican tropics. *Trop Ani Health Prod*; 36:135-143.

58. **Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso SH, Santamaría VM, Rosario-Cruz R.** 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatán, México. *Vet Parasitol*; 136: 335-442.
59. **Rosario-Cruz R, Almazán C, Miller RI, Domínguez-García DI, Hernández-Ortíz R, de la Fuente J.** 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Fron Bios*; 14: 2657-2665.
60. **Roush RT.** 1993. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol Today*; 9:174-9.
61. **SENASICA.** Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus* spp. Viernes 19 de mayo de 1995.
62. **Sonenshine DE, Kocan KM, de la Fuente J.** 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol*; 22:550-551.
63. **Sutherst RW, Maywald GF, Kerr JD, Siegeman DA.** 1983. The effect of the cattle tick *Boophilus microplus* on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Aust J Agr Res*; 34:317-27.
64. **Valdés M, Méndez L, Quintana Y, Montero C, Machado H, Leonart R, Borroto C.** 2005. Evaluación de la eficacia en ensayos controlados del inmunógeno Gavac Plus contra dos cepas Argentinas de la garrapata *Boophilus microplus*. Congreso de Biotecnología Habana 2005. La Habana, Cuba. Nov 27–Dic 2.
65. **Vargas M, Montero C, Pérez D, Sánchez D, Machado H, Joglar M, Rodríguez M, Leonart R.** 2005. Comparación de dos esquemas de inmunización en bovinos con el inmunógeno Gavac Plus (tres dosis iniciales contra dos dosis). Congreso de Biotecnología Habana 2005. La Habana, Cuba. Nov 27–Dic 2.
66. **Vega MC.** 1991. Actualidad e importancia de las enfermedades del ganado causadas por hemoparásitos. II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Oaxtepec, Mor. México. pp. 144-150.
67. **Willadsen P, Mckenna RV, Riding GA.** 1988. Isolation from the cattle ticks *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int J Parasitol*; 18:183–189.
68. **Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahnstein J, Cobon GS, Gough JM.** 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J of Immunol*; 143:1346-1351.
69. **Willadsen P, Kemp D.** 1998. Vaccination with "Concealed" antigens for tick control. *Parasitol Today*; 4,199.
70. **Willadsen P.** 2009. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope?. *Trends Parasitol*; 24: 164-167.

ANEXOS

Anexo 1. Bovinos en los corrales de la posta zootécnica de la FMVZ-UAT.



Anexo 2 A y B. Inmunización de bovinos.



Anexo 3 A. Bovinos en corraletas individuales (infestadero).

Anexo 3 B. Colocación de celdas de algodón.

Anexo 3 C. Infestación con larvas de garrapatas.





Anexo 4 A. Obtención de muestras de sangre.

Anexo 4 B y C. Obtención y almacenamiento de suero.



