

# DESARROLLO Y APLICACIÓN EN BOVINOS DE LA NUEVA FORMULACIÓN VACUNAL Gavac<sup>plus</sup> CONTRA LA GARRAPATA *Boophilus microplus*

Antonio Enríquez,<sup>1†</sup> Oscar Boué,<sup>1</sup> Miguel Redondo,<sup>2</sup> Carlos Montero,<sup>2</sup>  
Héctor Machado,<sup>1</sup> Marisdania Joglar,<sup>2</sup> Alejandro Soto,<sup>1</sup>  
Manuel Rodríguez,<sup>2</sup> José de la Fuente<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Desarrollo Tecnológico, <sup>2</sup>División de Genética de Células de Mamíferos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, Apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba. Telf: (53-7) 21 8466; Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: gavac@cigb.edu.cu

## ABSTRACT

A new formulation of the vaccine against the cattle tick *Boophilus microplus*, named Gavac<sup>plus</sup>, has been developed. It keeps constant the quantity of the active principle (protein Bm86) in half the volume of the traditional vaccine Gavac<sup>®</sup>. This paper reports a field trial involving 1 062 animals vaccinated with Gavac<sup>®</sup> and with Gavac<sup>plus</sup>. The herds in fourteen dairy cattle farms with elite Holstein and crossbred cattle were separated into four groups, vaccinated with Gavac<sup>®</sup> or Gavac<sup>plus</sup> using two and three immunizations of each one. All vaccinated groups showed similar antibody response ( $P = 0.24$ ) with antibody titers sufficient to confer protection to tick infestations. The application of Gavac<sup>plus</sup>, which elicits the same immunological response as Gavac<sup>®</sup>, production cost and cattle handling are reduced, production plant productivity is increased and calves can be immunized since the first month after birth.

Keywords: Bm86, cattle, Gavac, formulation, tick, vaccine

*Biotecnología Aplicada* 1999;16:15-17

## RESUMEN

Se ha desarrollado una nueva formulación de la vacuna contra la garrapata *Boophilus microplus*, denominada Gavac<sup>plus</sup>. Consiste en mantener constante la cantidad de principio activo (proteína Bm86) en la mitad del volumen de la dosis de la vacuna tradicional Gavac<sup>®</sup>. En este trabajo se reportan los resultados de un estudio de vacunación con Gavac<sup>®</sup> y Gavac<sup>plus</sup> en 1 062 animales en condiciones de campo. Los animales de la raza Holstein y mestizos (*Bos taurus* x *Bos indicus*), procedentes de 14 vaquerías, fueron distribuidos en cuatro grupos: vacunados con Gavac<sup>®</sup> o Gavac<sup>plus</sup> con dos y tres inmunizaciones de cada una por vía intramuscular profunda. Se demostró que los niveles de anticuerpos anti-Bm86 no difieren significativamente entre los grupos vacunados ( $P = 0,24$ ), lo cual implica que todos se encuentran protegidos de la infestación por garrapatas. Los terneros a partir de un mes de nacidos, distribuidos uniformemente en todas las vaquerías, presentaron títulos de anticuerpos al mismo nivel que el resto de los bovinos. Con la aplicación de Gavac<sup>plus</sup>, cuyos resultados en condiciones de campo no difieren de los de Gavac<sup>®</sup>, se disminuye el costo de producción, se aumenta la productividad de la planta, se reduce el manejo del ganado por la disminución del número de dosis, y se hace posible la aplicación a terneros a partir del primer mes de nacidos.

Palabras claves: Bm86, bovinos, formulación, garrapata, Gavac, vacuna

## Introducción

La garrapata del ganado bovino, *Boophilus microplus*, constituye un vector transmisor de enfermedades severas y un agente debilitante del ganado en las áreas de clima tropical y subtropical. Los métodos tradicionales de control de este organismo, han incluido el uso de sustancias químicas que no han sido totalmente exitosas, son costosas y causan graves problemas de contaminación ambiental.

La proteína Bm86, purificada de la superficie extracelular de las células digestivas del intestino de la garrapata *B. microplus*, induce una respuesta inmune en los animales que los protege parcialmente de la infestación con esta especie de garrapatas [1]. El gen que codifica para la expresión de la proteína Bm86 ha sido expresado en la bacteria *Escherichia coli* [2], en los hongos *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* [3] y en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* [4].

La vacuna Gavac<sup>®</sup>, que contiene como principio activo a la proteína recombinante Bm86 expresada en la levadura *P. pastoris*, ha reducido de una manera significativa la población de *B. microplus* en condiciones de campo, tanto en Cuba, como en otros países de América Latina [5-11]. La aplicación de Gavac<sup>®</sup> permite también reducir la transmisión de la babesiosis y el número de tratamientos garrapaticidas, lo cual redundará en un ahorro importante para la industria ganadera equivalente, en Cuba, a 23.40 USD/animal/año [11].

Las dosis para la protección con Gavac<sup>®</sup> son aplicadas en las semanas cero, cuatro y siete, y aproximadamente cada seis meses a partir de la primera vacunación. Cada dosis contiene 100 µg del antígeno Bm86 emulsionados en 2 mL de una fase oleaginosas. Además, Gavac<sup>®</sup> ha resultado ser efectiva en terneros a partir de cuatro meses de edad.

1. Johnston LAY, Kemp DH, Person RD. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extract derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int J Parasitol* 1986;6:27-34.

2. Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9657-61.

3. Turnbull IF, Smith DRJ, Sharp PJ, Cobon GS, Hynes MJ. Expression and secretion in *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick *Boophilus microplus* by using the fungal *amdS* promoter system. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:2847-52.

Se ha desarrollado una nueva formulación llamada Gavac<sup>plus</sup>, caracterizada por la disminución del volumen de la dosis a 1 mL con la misma cantidad de antígeno. En este trabajo, se reporta la aplicación de la nueva formulación en condiciones de campo, la factibilidad de reducir a dos el número de dosis aplicadas, tanto con Gavac<sup>®</sup>, como con Gavac<sup>plus</sup>, y los resultados de la vacunación de terneros con ambas a partir de un mes de nacidos.

## Materiales y Métodos

### Formulación de la vacuna Gavac<sup>plus</sup>

La nueva formulación Gavac<sup>plus</sup> fue elaborada bajo las mismas condiciones de la producción industrial de Gavac<sup>®</sup> [5]. Los tres lotes confeccionados fueron evaluados satisfactoriamente desde los puntos de vista físico-químico y biológico.

### Diseño experimental

Los animales se dividieron en cuatro grupos, atendiendo a las características de las razas y cruces, como se muestra en la Tabla 1. La edad mostró una distribución normal con una media de  $6 \pm 3$  años. Las razas de éstos fueron fundamentalmente Holstein y mestizos (*Bos taurus* x *Bos indicus*). El estado reproductivo de las vacas en producción lechera resultó ser una variable aleatoria. Los terneros se dividieron en dos grupos, uno de 44 entre uno y cuatro meses de edad y otro de 33 animales donde estaban los mayores de cuatro meses, seleccionados teniendo en cuenta la fecha de nacimiento en el momento de la primera vacunación. Los terneros se distribuyeron aleatoriamente en los cuatro esquemas de vacunación estudiados.

### Vacunación

La vacuna fue aplicada en dosis de 1 mL para Gavac<sup>plus</sup> y 2 mL para Gavac<sup>®</sup> por vía intramuscular profunda en la tabla del cuello próximo a los omóplatos o en la región glútea aleatoriamente, mediante el empleo de jeringuillas metálicas de 10 mL, con agujas 14 o 16 x 1½. Para ambas vacunas, se utilizaron los esquemas de dos dosis en las semanas cero y cuatro, y tres dosis en las semanas cero, cuatro y siete. Todos los esquemas incluyeron la revacunación a los seis meses a partir de la primera inmunización.

### Muestreo serológico

En el grupo dos (Tabla 1), que utilizó la vacunación tradicional (tres dosis de Gavac<sup>®</sup>), se extrajo sangre a

20% de los animales. En los restantes grupos, se muestreó el 100% de los animales. En los cuatro grupos se tomaron muestras de sangre en el momento de aplicar cada dosis (semanas cero, cuatro y siete), 21 días después de la última dosis y seis meses después de la primera.

### Determinación del título de anticuerpos anti-Bm86

El título de anticuerpos anti-Bm86 en suero se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), donde las placas (Polysorp, Dinamarca) se sensibilizaron con 100 µg por pozo de antígeno Bm86 recombinante purificado [12], diluido en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. Las placas se incubaron durante 3 h a 37 °C y después, para eliminar el exceso de antígeno, se lavaron tres veces con tampón fosfato salino, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1,5 mM, NaCl a 0,14 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 8 mM (PBS) a 50 mM pH 7 con Tween 20 a 0,5%. El bloqueo se realizó con leche descremada a 2%. Se añadieron 100 µL de muestra de suero diluida en PBS en diluciones dobles seriadas a partir de 1/640 y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Se lavó tres veces con la misma solución anterior y se añadieron 100 µL por pozo de anti-IgG bovino de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham, Gran Bretaña). Posteriormente, se incubó 40 min a 37 °C y se repitieron los tres lavados. Para revelar la reacción se añadió el sustrato cromogénico orto-fenilendiamina (OPD) diluido en tampón citrato/fosfato pH 5, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y se determinó la absorbancia a 492 nm.

### Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre los grupos, se utilizó el método del análisis de varianza de una variable (ANOVA de un solo factor) para una confiabilidad de 95%. Cuando hubo diferencias ( $P < 0,05$ ), se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con el fin de determinar el o los grupos diferentes. Se utilizó la media geométrica cuando se compararon los títulos de anticuerpos.

## Resultados y Discusión

En la Tabla 2 se muestra el comportamiento del título medio de anticuerpos anti-Bm86 para cada grupo experimental en el momento de aplicar cada una de las dosis, veintidós días después de la última y seis meses después de la primera vacunación.

En la segunda dosis, el grupo 1 (Tabla 2) mostró un título medio significativamente superior ( $P = 0,001$ ) al resto de los grupos. En este momento, los grupos 1 y 2

4. Rodríguez M, Rubiera R, Penichet ML, Montesino R, Cremata J, Falcon V, et al. High-level expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 1994;33:135-46.

5. Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandíe H, Soto A, et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac<sup>®</sup> against cattle tick. *Vaccine* 1997;15:414-22.

6. Rodríguez M, Penichet ML, Mouriz AE, Labarta V, Luaces L, Rubiera R, et al. Control of *Boophilus microplus* population in grazing cattle vaccinated with the recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1995;57:339-49.

7. Rodríguez M, Montero C, Labarta V, de la Fuente J. Effect of vaccination with Gavac<sup>®</sup> on the incidence of *Babesia bovis* infections and the reduction in the number and frequency of acaricide treatments in cattle under production conditions in Cuba. In: de la Fuente J, editor. *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*. La Habana: Elfos Scientiae; 1995.p.187-94

8. Massard CL, da Fonseca AH, Pinheiro VRE, de Oliveira JB, Moraes da Silva KM. Evaluation of recombinant Bm86 "Gavac" vaccine against the tick *Boophilus microplus* in Brazil. *R Bras Med Vet* 1995;17:167-73.

9. Lamberti J, Signorini A, Mattos C, D'Agostino B, Citroni D, Bacos E, et al. Evaluation of the recombinant vaccine against *Boophilus microplus* in grazing cattle in Argentina. In: de la Fuente, editor. *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*. La Habana: Elfos Scientiae; 1995.p.205-27.

10. Vanegas LF, Parra SA, Vanegas CG, de la Fuente J. Commercialization of the recombinant vaccine Gavac<sup>®</sup> against *Boophilus microplus* in Colombia. In: de la Fuente J, editor. *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*. La Habana: Elfos Scientiae; 1995.p.177-85.

11. de la Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, García-García JC, Méndez L, et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1998;16:1118-23.

12. Boué O, Sánchez K, Tamayo G, Hernández L, Reytor E, Enríquez A. Single-step purification of the recombinant Bm86 protein produced in *Pichia pastoris* by salting-out and by acid precipitation of contaminants. *Biotechnol Techniques* 1997;11:561-5.

Tabla 1. Distribución de los animales en cada grupo experimental.

Grupos	Vacunado con	No. de dosis <sup>a</sup>	No. de vaquerías <sup>b</sup>	No. de animales
1	Gavac <sup>®</sup>	2	2	154
2	Gavac <sup>®</sup>	3	8	709
3	Gavac <sup>plus</sup>	2	2	105
4	Gavac <sup>plus</sup>	3	2	94

<sup>a</sup>Primera dosis aplicada el 1 de abril, segunda dosis el 28 de abril y la tercera dosis el 20 de mayo de 1997.

<sup>b</sup>Las vaquerías utilizadas para el grupo 1 fueron "Las Mercedes" y "Vaquería 5"; para el grupo 2 fueron "Revolución", "Pedregal", "Granma", "El Congreso" y "Vaquerías 6, 8, 9 y 10"; para el grupo 3 "13 de Marzo" y "La Micro" y para el grupo 4 "Muestreo" y "Vaquería 4", todas pertenecientes al Instituto Politécnico "Villena-Revolución" en el Municipio Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba.

Tabla 2. Comportamiento de la respuesta inmune en los animales vacunados en el momento de aplicar cada dosis para cada grupo experimental.

Grupos <sup>a</sup>	No. de animales <sup>b</sup>	Título medio de anticuerpos anti-Bm86 ± error estándar <sup>c</sup>				
		1 <sup>a</sup> dosis	2 <sup>a</sup> dosis	3 <sup>a</sup> dosis	21 días después de la última dosis	Seis meses después de la 1 <sup>a</sup> dosis
1	143	0	5 746 <sup>d</sup> ± 506	-	8 755 <sup>d</sup> ± 1 838	3 152 <sup>d</sup> ± 422
2	142	0	3 503 <sup>d</sup> ± 630	13 775 <sup>d</sup> ± 1 573	8 769 <sup>d</sup> ± 941	2 694 <sup>d</sup> ± 905
3	102	0	3 864 <sup>d</sup> ± 261	-	16 976 <sup>d</sup> ± 827	2 517 <sup>d</sup> ± 318
4	92	0	3 371 <sup>d</sup> ± 900	9 565 <sup>d</sup> ± 1 500	12 342 <sup>d</sup> ± 1 250	3 409 <sup>d</sup> ± 376

<sup>a</sup>Los grupos experimentales corresponden a los descritos en la Tabla 1.

<sup>b</sup>Corresponde al número de animales muestreados.

<sup>c,d</sup>Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los animales fueron muestreados en el momento de aplicar la dosis vacunal.

eran experimentalmente iguales, y las diferencias se deben posiblemente a que ambos se encuentran en vaquerías con diferentes condiciones de alimentación, manejo y otras variables como la temperatura y la humedad relativa, que no son controladas. En tanto, mientras mejor sea el estado nutricional y de salud de los animales, mejor será la respuesta frente a la vacunación y, por consiguiente, el efecto sobre la garrapata. Este concepto es válido para cualquier vacunación y puede ser motivo de una respuesta pobre en algunos animales [11]. No obstante, en todos los casos los animales se encuentran protegidos contra la infestación por garrapatas *B. microplus* [11].

En los grupos en que se aplicó la tercera dosis, no se obtuvo ninguna diferencia. A los 21 días después de la última dosis, los grupos vacunados con Gavac<sup>®</sup> y con Gavac<sup>plus</sup> tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,51$ ), aunque para el caso del grupo control hubo un comportamiento inusual, al no alcanzarse a los 21 días después de la última dosis el valor más alto del título de anticuerpos. Tampoco hubo diferencias a los seis meses después de aplicada la primera dosis (Tabla 2).

En general, el comportamiento en cada momento garantiza que ambas formulaciones confieran una protección similar al ganado inmunizado frente a la infestación con garrapatas, ya que se ha encontrado una correlación entre el título de anticuerpos anti-Bm86 y el daño provocado en las diferentes etapas del ciclo de multiplicación de la garrapata *B. microplus* [11]. Si la respuesta inmunológica de los animales cuando se utiliza la nueva formulación Gavac<sup>plus</sup> no difiere con respecto a la formulación tradicional, el daño esperado sobre las garrapatas debe ser similar.

Para los dos grupos de terneros, de uno a cuatro y mayores de cuatro meses, distribuidos aleatoriamente en todas las vaquerías, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P = 0,89$ ) en cada uno de los momentos de muestreo (Figura 1).

La reducción del volumen de dosis de la vacuna contra la garrapata, no crea ningún problema durante la aplicación de la vacuna; por el contrario, en la fase de campo se observó que ocurre una mejor inoculación del producto.

El esquema tradicional de vacunación implicaba la aplicación de tres dosis de la vacuna, pero los nuevos estudios permitieron observar que los títulos de anticuerpos después de la segunda dosis tienen un efecto prolongado, hasta seis meses después de la primera vacunación, lo cual no difiere del esquema tradicional. Esto garantiza que ambas vacunas puedan ser aplicadas con dos dosis, una en la semana cero y la otra en la semana cuatro.

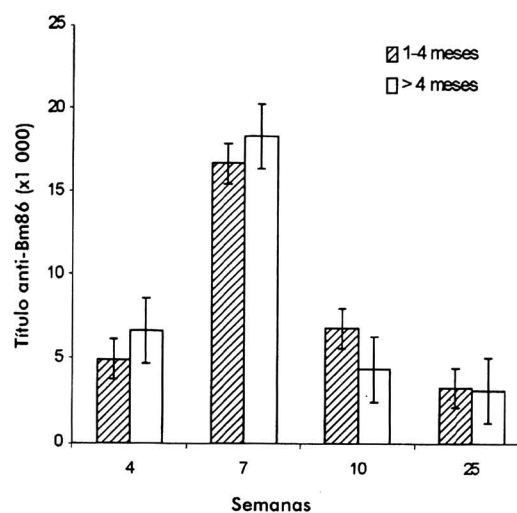


Figura 1. Comportamiento de la respuesta inmunológica (título medio  $\pm$  desviación estándar) de los terneros\* entre uno y cuatro meses y mayores de cuatro meses.

\*Los terneros (44 entre uno y cuatro meses y 33 mayores de cuatro meses) vacunados estuvieron aleatoriamente distribuidos en las vaquerías "II Congreso", "Granma", "Revolución", "Las Mercedes", "Muestrario", "La Micro", "13 de Marzo" y "Vaquerías 4, 5, 6, 8 y 9", todas del Instituto Politécnico "Villena-Revolución" del municipio Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. Éstos fueron vacunados entre el 2 de abril y el 20 de mayo de 1997.

Durante estos ensayos se pudo determinar también que los terneros a partir de un mes de nacidos, responden bien inmunológicamente ante las vacunas Gavac<sup>®</sup> y Gavac<sup>plus</sup>, para conferirles protección de la infestación por garrapatas *B. microplus*.

Desde el punto de vista tecnológico, con Gavac<sup>plus</sup> se hace un uso más racional de los componentes más costosos de la formulación y el envase de Gavac<sup>®</sup>, duplicándose la capacidad de la planta. Mientras que, por otra parte, se logra una mejor inoculación del producto en los animales, se reduce el número de dosis y el manejo del ganado que esto conlleva, lográndose títulos de anticuerpos que permiten que el ganado esté inmunizado contra la infestación por garrapatas *B. microplus* desde el primer mes del nacimiento.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración y el apoyo brindado por los profesores, estudiantes y trabajadores del Instituto Politécnico "Villena-Revolución", en especial a su Director Técnico de Veterinaria, doctor José M Recalde Rivero.