

Deshidratación de eritrocitos parasitados con *Babesia* spp como alternativa inmunoprolifáctica. Resultados preliminares

Dehydration of erythrocytes parasitized with *Babesia* spp as an immunoprophylactic alternative. Preliminary results

Florencia Del Río Álvarez^{1,2,8}, María E. Peichoto^{2,3}, Santiago Palma⁴, Belkys Maletto⁴, Marcos Guidoli⁵, Laura Huber⁶, Laura Lozina^{1,2,7}

RESUMEN

La inmunoprolifaxis de la babesiosis bovina cuenta con dos presentaciones de una vacuna viva atenuada (fresca y ultracongelada). Pese a ser efectivas, su durabilidad, así como las condiciones necesarias para su traslado y manipulación, las hacen poco prácticas. La incorporación de una tercera presentación, utilizando merozoitos deshidratados como inmunógenos, constituye una innovadora alternativa, que combina practicidad y estabilidad en el tiempo. El objetivo del presente trabajo fue ensayar procesos de deshidratación y sustancias criopreservadoras y rehidratantes. Con este fin, eritrocitos altamente parasitados con *Babesia bovis* y *B. bigemina* fueron sometidos a dos técnicas de

¹ Cátedra de Farmacología y Toxicología, Departamento de Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

³ Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) - ANLIS «Dr. Carlos G Malbrán», Puerto Iguazú, Misiones, Argentina

⁴ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina

⁵ Cátedra de Microbiología, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

⁶ Laboratorio de Investigaciones, Área de Fito Odontología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

⁷ Litoral Biológicos S.R.L., Puerto Tirol, Chaco, Argentina

⁸ E-mail: delrioalvarezflores@gmail.com

Recibido: 23 de julio de 2021

Aceptado para publicación: 9 de febrero de 2022

Publicado: 27 de abril de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

deshidratación: liofilización y secado por aspersión. A su vez, para el proceso de liofilización se ensayaron varios lioprotectores: Dimetilsulfóxido, Glicerol, Dextrosa y Polivinilpirrolidona (PVP). El único que logró un polvo adecuadamente deshidratado, de aspecto cristalino y quebradizo al tacto fue la PVP. Posteriormente, los eritrocitos obtenidos por ambas técnicas fueron reconstituidos con soluciones de sacarosa (0.25, 0.5, 1 M), solución salina 0.9%, solución Vega y Martínez, buffer fosfato y agua destilada. La microscopía óptica con objetivo de inmersión evidenció que el mejor reconstituyente tanto para los glóbulos rojos liofilizados como para los secados por aspersión fue la solución de sacarosa 0.25 M, pudiéndose apreciar un alto número de glóbulos rojos liofilizados y reconstituidos con morfología conservada. Extrapolando este comportamiento a los hemoparásitos en estudio, resultaría promisorio su aplicación como inmunógenos.

Palabras clave: babesiosis, inmunoprofilaxis, eritrocitos, liofilización, secado por aspersión

ABSTRACT

Immunoprophylaxis for bovine babesiosis has two presentations of a live attenuated vaccine (fresh and deep-frozen). Despite being effective, their durability, as well as the conditions necessary for their transfer and handling, make them impractical. The incorporation of a third presentation, using dehydrated merozoites as immunogens, constitutes an innovative alternative, which combines practicality and stability over time. The objective of this work was to test dehydration processes and cryopreservative and rehydrating substances. For this, erythrocytes highly parasitized with *Babesia bovis* and *B. bigemina* were subjected to two dehydration techniques: lyophilization and spray drying. In turn, for the lyophilization process, several lyoprotectants were tested: Dimethylsulfoxide, Glycerol, Dextrose and Polyvinylpyrrolidone (PVP). The only one that achieved a properly dehydrated powder, crystalline in appearance and brittle to the touch was the PVP. Subsequently, the erythrocytes obtained by both techniques were reconstituted with sucrose solutions (0.25, 0.5, 1 M), 0.9% saline solution, Vega y Martínez solution, phosphate buffer and distilled water. Optical microscopy with an immersion objective showed that the best reconstituent for both lyophilized and spray-dried red blood cells was the 0.25 M sucrose solution, showing a high number of lyophilized and reconstituted red blood cells with preserved morphology. Extrapolating these results to the haemoparasites under study, their application as immunogens would be promising.

Key words: babesiosis, immunoprophylaxis, erythrocytes, freeze-drying, spray-drying

INTRODUCCIÓN

Los protozoarios intraeritrocitarios *Babesia bovis* y *B. bigemina* son los agentes causales de la babesiosis bovina, una

enfermedad transmitida por la garrapata común del bovino, *Rhipicephalus microplus*, que provoca importantes pérdidas económicas en la ganadería de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Álvarez y Figueroa, 2007).

Los métodos actuales de control de la enfermedad involucran el tratamiento farmacológico de los animales afectados, el control de la garrapata por medio de acaricidas y la vacunación con cepas atenuadas de *Babesia* spp que garantiza un fuerte estado de protección inmunológica y dura toda la vida (Martínez *et al.*, 2014). En el mercado se dispone de vacunas trivalentes que incluyen un tercer hemoparásito, *Anaplasma centrale*, que provee una inmunidad cruzada sobre *A. marginale*, rickettsia que, junto a los protozoarios *B. bovis* y *B. bigemina* forman el complejo «tristeza bovina». Presentaciones de tipo fresca y ultracongelada se encuentran disponibles para la profilaxis de este complejo, pero ambas presentan ciertos inconvenientes. En el primer caso, por sus características extemporáneas, donde el tiempo es el factor limitante; en tanto que en el segundo caso se requiere de termos de nitrógeno líquido para su traslado y manipulación (Aguirre *et al.*, 1991).

La formulación de una tercera presentación utilizando merozoitos deshidratados como inmunógenos podría proveer una estrategia que resolvería los problemas de practicidad, durabilidad y seguridad, ya que implicaría un paso más en la atenuación de la cepa vacunal (Gerber *et al.*, 2014) y facilitaría su manipulación por su método de conservación.

Para lograr la deshidratación por liofilización de eritrocitos parasitados es necesaria la incorporación de soluciones lioprotectoras. Las soluciones de polivinilpirrolidona (PVP) e hidratos de carbono, en especial los monosacáridos, proporcionan medios que permiten que los eritrocitos sean sometidos a los esfuerzos de congelación y reconstitución, dando lugar a células de sangre roja deshidratadas por congelación que pueden ser reconstituidas y funcionar normalmente en el mamífero (Goodrich *et al.*, 1989). La obtención de un protocolo ideal para criopreservar depende del conocimiento de las propiedades de las células o tejidos. Este proceso está afectado por variables como

especie, tipo y estadio de la célula a congelar. Existen criopreservadores de elevada masa molecular que no son permeables a la membrana y, por lo tanto, actúan en el medio extracelular promoviendo una rápida deshidratación por efecto osmótico. Son ejemplos de ellos la PVP, el polietilenglicol y las lipoproteínas de yema de huevo (Cossio Bayugar *et al.*, 2011).

El secado por pulverización o *spray drying* consiste en la producción de un polvo seco a partir de un líquido o una suspensión. Implica la pulverización de los glóbulos rojos (GR), creando una mayor superficie de contacto, a la que se le aplica calor como método de deshidratación. Es el método preferido de secado para muchos materiales térmicamente sensibles, como alimentos y productos farmacéuticos (Mujumdar, 2007; Tarara *et al.*, 2003). La deshidratación por pulverización de compuestos utilizados en la industria farmacéutica se encuentra reportado en la memoria descriptiva de la patente de Tarara *et al.*, 2003.

En el presente trabajo se describen ensayos con diferentes procesos de deshidratación, así como con sustancias criopreservadoras y reconstituyentes para obtener eritrocitos deshidratados y reconstituidos, altamente parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina* como alternativa inmunoproláctica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y Mantenimiento de Cepas

Eritrocitos parasitados fueron obtenidos a partir de cultivos *in vitro* en fase estacionaria en condiciones de microaerofilia de 48 h de *B. bovis* R1A y *B. bigemina* S1A, cepas vacunales, según protocolos establecidos por Ristic y Levy (1980). Se iniciaron los cultivos a partir de crioviales proporcionados por el Laboratorio Litoral Biológicos S.R.L. (Puerto Tirol, Chaco), preservados con PVP di-

suelta en solución Vega y Martínez (VYM) (Vega *et al.*, 1985) en una atmósfera de CO₂ 5%, O₂ 5% y balance de N₂ 90%. Los cultivos *in vitro* contienen un 10% de paquete globular (PG) y medio completo (MC) formulado con 60% de Medio 199 y 40% de suero normal bovino. El cambio de medio se realizó cada 24 h, desechando el sobrenadante (SN) que contiene residuos del metabolismo de los eritrocitos y protozoarios, y reemplazándolo con MC nuevo. Cada 48 h se realizaron subcultivos para evitar el exceso de hemoparásitos. Una vez logradas parasitemias superiores a 10 y 7% para *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente, los eritrocitos fueron centrifugados a 2348 g durante 10 min a 4 °C, se desechó el SN y el PG fue colectado para su deshidratación.

Deshidratación por Liofilización

El PG fue fraccionado y mezclado en partes iguales con:

- a) Solución al 10% de PVP disuelta en solución VYM.
- b) Tampón liofilizante conteniendo una concentración 2 M de dextrosa en solución de buffer fosfato (PBS) a pH 7.2.
- c) Tampón liofilizante conteniendo una concentración de 1.5 M de glicerol en solución de PBS a pH 7.2.
- d) Tampón liofilizante conteniendo 50% Dimetilsulfóxido (DMSO) en solución de PBS a pH 7.2.

La suspensión de eritrocitos, con la adición de criopreservadores, se transfirió a crioviales en alícuotas de 5 ml. Los viales fueron expuestos a la fase de vapor del nitrógeno líquido, a una tasa de 20 °C/min, en una unidad de congelación programable. Cuando la temperatura alcanzó -80 °C los viales se trasladaron rápidamente al termo de nitrógeno líquido. Las muestras congeladas fueron transferidas a un liofilizador de banco superior (L-T8-A-B3T- RITIFICOR) que funciona a menos de 100 mmHg con una temperatura de cámara interior de -56 °C. Las muestras fueron dejadas hasta que se deshidraten a fondo (6-24 h). Posteriormente se dejó que

los tubos vuelvan a temperatura ambiente. Los liofilizados fueron mantenidos en freezer a -20 °C hasta su uso.

Deshidratación por *Spray-drying*

El PG mantenido a 4 °C fue fraccionado en alícuotas y secado por aspersión en un Mini Spray Dryer Buchi B-290 (BÜCHI Labortechnik AG), de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Córdoba (UNC), bajo condiciones controladas, a saber: temperatura de ingreso: 45 °C, aspiración: 75%, bomba: 5%, nozzle cleaner: 2 rotámetro: 50 mmHg. Finalizada la deshidratación, el material se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

Reconstitución de las Muestras

El PG se volvió a hidratar a 37 °C usando diferentes reconstituyentes: soluciones de sacarosa (0.25, 0.5 y 1 M), solución salina 0.9%, VYM, PBS o agua destilada. Se añadió un volumen de solución rehidratante equivalente al volumen inicial de la muestra antes de la deshidratación.

Microscopía Óptica

Los rehidratados fueron homogeneizados suavemente en placas de 24 pocillos, asegurando la reconstitución completa del deshidratado. Se realizaron extendidos finos, fijados con metanol y teñidos con Giemsa al 10% que fueron observados al microscopio óptico (MO) en aumento 1000x.

Microscopía Electrónica de Barrido

Se procedió a fijar en una membrana 0.22 µm de Nylon, usando formol al 10%. Las muestras fueron deshidratadas, usando alcohol al 70% y secadas a punto crítico con CO₂ líquido, durante 15 min. Luego fueron montadas en papel aluminio y metalizadas con oro paladio. Se realizó la observación en un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL 5800 LV.

Reactivación de las Cepas Deshidratadas en Cultivos *in vitro*

Se realizó la incubación de GR parasitados con *Babesia* spp y deshidratados por liofilización o por aspersión en placas de 24 pocillos y botellas de cultivo F25. La reconstitución de los volúmenes fue a partir de 20 ml totales de MC y 5% de GR. La placas y botellas se mantuvieron en cámara incubadora con una mezcla especial de gases (CO₂: 5%; O₂: 5%; balance de N₂: 90%), y se dejaron cinco días con tres pasajes de gases diarios dentro de una incubadora de CO₂ a 37 °C y humedad del 80%. Cada 24 h, 800 µl y 10 ml del SN, respectivamente, fueron removidos de los cultivos y reemplazado por la misma cantidad de MC. Asimismo, cada 48 h se realizó el cambio de medio hasta completar los cinco días. Para determinar la parasitemia se hicieron frotis diarios teñidos con Giemsa al 10%.

RESULTADOS

Tras el proceso de liofilización, las suspensiones de eritrocitos parasitados con *Babesia* spp utilizando 1.5 M de glicerol en solución de PBS no lograron una adecuada deshidratación, lo cual podría deberse a una posible ebullición del contenido de los crioviales. Similares resultados se obtuvieron con las soluciones de Dextrosa y DMSO. Sin embargo, las muestras en las que se utilizó PVP como lioprotector dieron como resultado un polvo adecuadamente deshidratado, con aspecto cristalino y quebradizo al tacto.

A partir del proceso de secado por aspersión se obtuvo un polvo fino, homogéneo y adecuadamente deshidratado. El rendimiento de secado del PG fue de 35.8% para *B. bovis* y de 35.6% para *B. bigemina*.

La reconstitución del PG liofilizado con los disolventes evidenció que la solución de sacarosa 0.25 M y el PBS presentaron un alto porcentaje de recuperación «relativa», tras

comparar por MO los extendidos de GR rehidratados con los de GR frescos (Figura 1A,B). Se evidenció que hasta un 50% de los eritrocitos liofilizados presentaron una morfología conservada al utilizar solución de sacarosa 0.25 M en su reconstitución (Figura 1C,D), bajando dicha tasa de recuperación a 30% con PBS (Figura 1E,F). Bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo, los demás reconstituyentes no lograron proveer un medio adecuado para la rehidratación del PG liofilizado.

El PG pulverizado no logró un porcentaje de recuperación considerable, siendo el mismo menor al 20% al utilizar solución de sacarosa 0.25 M y por debajo del 10% para las demás soluciones rehidratantes (resultados no mostrados). Por otro lado, la observación del reconstituido utilizando MEB evidenció eritrocitos aislados con una morfología relativamente conservada al usar PBS como disolvente, siendo en segundo lugar la solución de sacarosa 0.25 M y en tercer lugar por la solución salina para ambos deshidratados (Figura 2). El tamaño de los eritrocitos osciló entre 3 a 5 µm, pudiéndose apreciar una reducción de entre 50 a 20% de su tamaño normal. Respecto a la reactivación de los parásitos contenidos en los eritrocitos deshidratados, luego de 5 d de incubación en cámara de gases no fue posible lograr un aumento de la parasitemia en los cultivos iniciados a partir del PG deshidratado por las dos técnicas utilizadas en este trabajo.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se llevó a cabo la deshidratación de eritrocitos parasitados con las dos especies de *Babesia* causantes de la babesiosis bovina. Para tal fin, se evaluaron dos técnicas, liofilización y secado por aspersión, las que operan bajo principios distintos, y buscan mantener la estructura de las células luego de la reconstitución. A su vez, se ensayaron diferentes soluciones liopreservadoras, para los ensayos de liofilización, y rehidratantes.

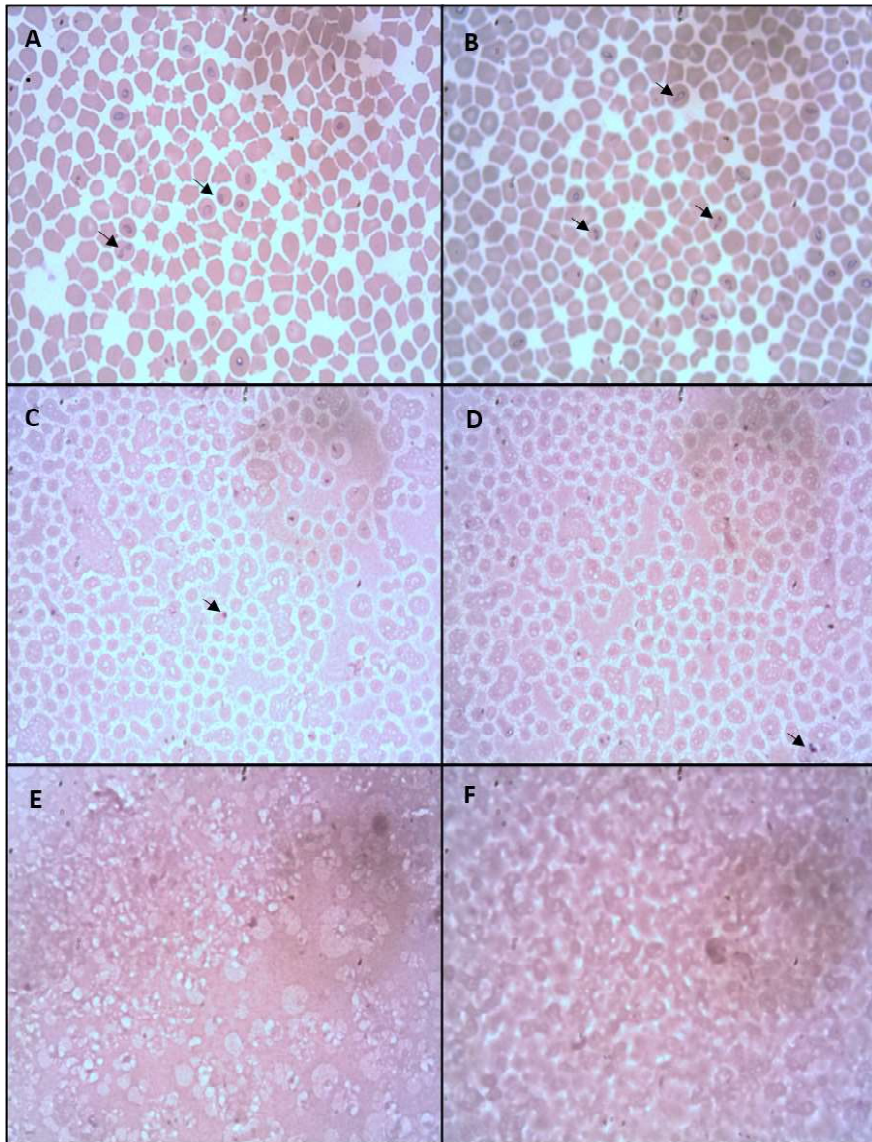


Figura 1. Imágenes de eritrocitos luego del proceso de liofilización. A, B. Frotis de cultivo *in vitro* de *B. bovis* (control) y *B. bigemina* (control), respectivamente. C, D. Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina*, liofilizados y reconstituidos con solución de sacarosa 0.25 M, respectivamente. E, F. Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina*, liofilizados y reconstituidos con buffer fosfato, respectivamente. Las flechas indica merozoitos de *Babesia* spp. 1000X

La liofilización consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas; que pasa directamente a un estado de vapor debido a que no hay presión molecular que lo impida. Las muestras que contienen la suspensión de microorganismos son previamente congeladas en nitrógeno lí-

quido e inmediatamente expuestas al vacío (Morales-García *et al.*, 2010). Bajo las condiciones del presente trabajo, la PVP fue el crioprotector más adecuado durante el proceso de liofilización. Las soluciones de PVP utilizadas como lioprotector dan como resultado eritrocitos capaces de resistir a los esfuerzos de deshidratación y reconstitución.

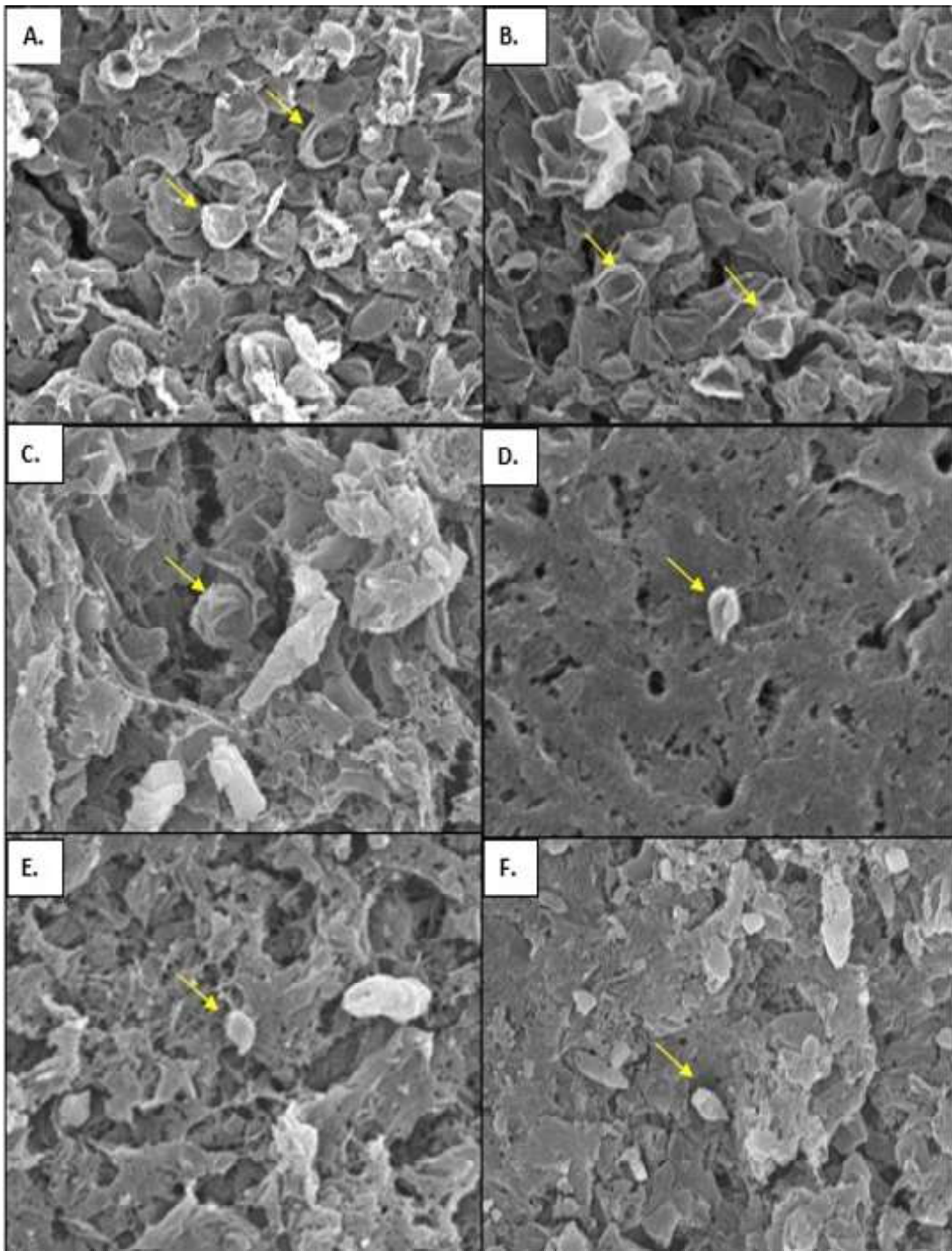


Figura 2. Imágenes de eritrocitos obtenidas con microscopio electrónico de barrido. A,C,E. Eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con buffer fosfato, solución de sacarosa 0.25 M y con solución fisiológica, respectivamente; B,D,F: Eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con buffer fosfato, con solución de sacarosa 0.25 M, y con solución fisiológica, respectivamente. Las flechas indican glóbulos rojos deshidratados y reconstituidos. 5000X

Su propiedad de no atravesar la membrana proporciona células de sangre roja deshidratadas por sublimación que pueden ser reconstituidas (Cossio Bayugar *et al.*, 2011).

Los criopreservadores constituidos por compuestos de baja masa molecular, como DMSO y glicerol, son permeables a la membrana y actúan desplazando el agua del interior de la célula, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares. Estas sustancias llamadas penetrantes, se utilizan en congelaciones a velocidad muy lenta. En la curva de liofilización se observó una incompleta deshidratación de las muestras al utilizar estas sustancias, posiblemente debido a la temperatura eutéctica de la mezcla de altas concentraciones de glicerol y PG. Según Day y Stacey (2007), si bien es posible lograr la liofilización utilizando glicerol o DMSO como lioprotectores, la curva de fases a la que debe someterse fue incompatible con la curva estandarizada con el liofilizador disponible en el laboratorio.

Por otro lado, los GR deshidratados por aspersión no lograron superar el 20% de recuperación al ser rehidratados. Alves-Filho *et al.* (2006), utilizando esta técnica lograron no solo mantener la viabilidad de los eritrocitos, sino además que fueran funcionales en un nuevo hospedador. Estos autores elaboraron una patente de secado por aspersión de GR humanos y reportaron condiciones de trabajo donde los eritrocitos fueron sometidos a temperaturas que no superaban la fisiológica para la especie (37 °C), manteniéndose preferiblemente en un rango de 1 a 10 °C, condiciones que no fueron logradas en el presente trabajo donde la temperatura de entrada fue de 45 °C. Asimismo, aquí no se incorporaron adyuvantes de secado en discrepancia con el mencionado estudio.

Otros autores, como Ananta *et al.* (2005) evaluaron la aplicación del secado por atomización en la producción de preparados a base de leche desnatada conteniendo bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus*.

Estos autores obtuvieron mejores resultados cuando se reconstituyeron las colonias al utilizar leche desnatada como vehículo de secado por pulverización, logrando una tasa de supervivencia microbiana del 60% a una temperatura de salida de 80 °C. En concordancia con dichos resultados, Barbosa *et al.* (2015) investigaron la supervivencia de dos bacterias ácido-lácticas en polvo de naranja obtenidos por liofilización, secado por aspersión y secado con aire caliente convectivo, no reportando mermas en el número de células obtenidas por las técnicas de aspersión y liofilización. Sin embargo, la liofilización permitió la supervivencia de un mayor número de células después del periodo de almacenamiento.

El almacenamiento de ambos deshidratados es un factor a tomar en consideración. En el presente trabajo, el PG secado por aspersión fue almacenado a 4 °C y el liofilizado en freezer a -20 °C. Según Zamora *et al.* (2006), quienes trabajaron con colonias de bacterias ácido-lácticas, el daño celular debido al liofilizado se observó inmediatamente después del secado, mientras que el daño debido al secado por aspersión no se hizo evidente hasta la fase de almacenamiento. Sin embargo, la disminución más rápida de la viabilidad de los cultivos secados por pulverización, en comparación con los cultivos liofilizados, se compensó con el mayor porcentaje de células viables obtenidas después de la deshidratación con agua de triptona estéril, lo que condujo a tasas de supervivencia comparables al final del periodo de almacenamiento.

La observación de la morfología celular por frotis evidenció una recuperación celular mayor para GR liofilizados que para secados por aspersión. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Huang *et al.* (2017), quienes reportan que la liofilización sigue siendo la técnica preferida para preservar las bacterias probióticas, aunque es un proceso costoso y demandante de tiempo. Por otro lado, el secado por aspersión es una técnica pre-

dominante en la industria láctea (Schuck *et al.*, 2016). El aumento en el área de la interfaz aire-líquido posterior a la pulverización aumenta drásticamente la cinética de secado y, generalmente, se admite que el secado ocurre en unos pocos segundos. En cambio, el secado por aspersión representa un menor costo energético específico y una mayor productividad. Pese a esto, sigue habiendo desafíos asociados con el uso del secado por atomización para producir cultivos viables, especialmente con cepas probióticas «sensibles» (Broeckx *et al.*, 2016; Fu y Chen, 2011; Peighambardoust *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se observaron discrepancias entre los resultados obtenidos con MO y MEB, ya que la recuperación celular fue muy baja en el segundo método, independientemente de la técnica de deshidratación o reconstituyente empleado. Estos resultados podrían explicarse por el estrés celular agregado en los procedimientos de fijado y secado a punto crítico (SPC) que los GR, previamente deshidratados y reconstituidos reciben al someterse al MEB, no logrando mantener la viabilidad de la membrana. Inoue y Osatake (1988) indican que, a pesar de que el método de SPC se usa ampliamente para secar materiales biológicos para MEB, existen problemas de artefactos inherentes con el mismo. Por otro lado, el método de liofilización también es una técnica para secar muestras biológicas que contienen agua, considerado inclusive superior al de SPC debido a la contracción menos visible de la muestra (Inoue y Osatake, 1988).

Finalmente, en este trabajo no fue posible lograr la reactivación de los GR y merozoitos de *Babesia* spp, en discrepancia con lo reportado por Marcotty *et al.* (2003), quienes lograron la reactivación (aunque con una viabilidad marcadamente reducida) de esporozoitos liofilizados de *Theileria parva*. Es importante destacar que en dicho trabajo se realizó la reactivación en ensayos *in vivo*, mientras que en este trabajo fue realizado en cultivo *in vitro*.

En conclusión, el presente estudio muestra un procedimiento para la deshidratación de dos de los componentes de la vacuna trivalente para la profilaxis de la tristeza bovina. El procedimiento de liofilización logró una reconstitución del 50% de eritrocitos parasitados con estructura conservada. No obstante, si bien aún falta probar su inoculación en la especie susceptible, este resultado es promisorio para la producción de una vacuna liofilizada.

Agradecimientos

A nuestro ejemplo y mentor, quien supo ser impulso fundamental para nuestros esfuerzos, por siempre en nuestra memoria y corazones, Dr. Elvio Ríos. El presente trabajo fue financiado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica- UNNE. Proyecto PI 17B/015.

LITERATURA CITADA

1. **Aguirre DH, Mangold AJ, Ríos LG, Guglielmone AA. 1991.** Respuesta clínica y evolución del peso corporal en terneras (*Bos taurus*) vacunadas simultáneamente contra babesiosis y anaplasmosis con inmunógenos vivos. *Med Vet* 8: 95-101.
2. **Álvarez MJA, Figueroa JV. 2007.** Revisión del desarrollo de una vacuna contra la babesiosis bovina en México. En: XXX Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, México.
3. **Alves-Filho O, Bergslien O, Bjorkn P, Magne Eikevik T, Strommen I. 2006.** Reconstitutable Dried Blood Products. United States Patent. [Internet]. Available in: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2-004057962>
4. **Ananta E, Volkert M, Knorr D. 2005.** Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J* 15: 399-409. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.004

5. **Barbosa J, Borges S, Amorim M, Pereira MJ, Oliveira A, Pintado ME, Teixeira P. 2015.** Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *J Funct Food* 17: 340-351. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.001
6. **Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. 2016.** Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm* 505: 303-318. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.-04.002
7. **Cossio Bayugar R, Rojas Martinez C, Miranda Miranda E, Alvarez Martinez JA, Figueroa Millan JV, Vega y Murguía CA. 2011.** Cultivo *in vitro* de *Babesia* spp. En: Cultivo *in vitro* de células animales y sus aplicaciones. INIFAP, México. p 131-136.
8. **Day JG, Stacey GN. 2007.** The principles of freeze-drying. Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2nd ed. Humana Press. p 15-38.
9. **Fu N, Chen XD. 2011.** Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Res Int* 44: 1127-1149. doi: 10.1016/j.foodres.-2011.03.053
10. **Gerber P, Xiao CT, Chen Q, Zhang J, Halbur PG, Opriessnig T. 2014.** The spray-drying process is sufficient to inactivate infectious porcine epidemic diarrhea virus in plasma. *Vet Microbiol* 174: 86-92. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.-09.008
11. **Goodrich RP, Williams CM, Franco RS, Weiner M. 1989.** Lyophilization of red blood cells. United States Patent. [Internet]. Available in: <https://patents.-google.com/patent/US4874690A/en>
12. **Huang S, Vignolles ML, Chen DX, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R. 2017.** Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: a review. *Trends Food Sci Tech* 63: 1-17. doi: 10.1016/j.tifs.2017.02.007
13. **Inoué T, Osatake H. 1998.** A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: the t-butyl alcohol freeze-drying method. *Arch Histol Cytol* 51: 53-59. doi: 10.1679/aohc.51.53
14. **Marcotty T, Berkvens D, Besa RK, Losson B, Dolan TT, Maddar M, Chaka G, et al. 2003.** Lyophilisation and resuscitation of sporozoites of *Theileria parva*: preliminary experiments. *Vaccine* 22: 213-216. doi: 10.1016/s0264-410x-(03)00564-4
15. **Martínez I, Jacobo R, Cipolini F, Martínez D, Storani C, Ragazzi A, Echaide I, et al. 2014.** Estudio prospectivo de las primo infecciones por *Babesia bovis* en terneros Brahman y Brangus de un área enzootica de Corrientes, Argentina. *FAVE Cienc Vet* 13: 41-47. doi: 10.14409/favecv.v13i1/2.4974
16. **Morales-García YE, Duque E, Rodríguez-Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras RB, Pérez-y-Terrón R, Muñoz-Rojas J. 2010.** Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología* 14: 10-29. doi: 10.5281/zenodo.-5525288
17. **Mujumdar AS. 2007.** Handbook of industrial drying. USA: CRC Press. 1348 p.
18. **Peighambardoust SH, Golshan Tafti A, Hesari J. 2011.** Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends Food Sci Tech* 22: 215-224. doi: 10.1016/j.tifs.2011.01.009
19. **Ristic M, Levy MG. 1980.** *Babesia bovis*: continuous cultivation in amicroaerophilous stationary phase culture. *Science* 207: 1218-1220. doi: 10.1126/science.7355284
20. **Schuck P, Jeantet R, Bhandari B, Chen XD, Perrone IT, Carvalho AF. 2016.** Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: a comprehensive critical review. *Dry Technol* 34: 1773-1790. doi: 10.1080/07373937.2016.-1233114

21. **Tarara TE, Weers JG, Kabalnov A, Schutt,EG, Dellamary LA. 2003.** Methods of spray drying pharmaceutical compositions. United States Patent. [Internet]. Available in: <https://patents.google.com/patent/US6565885B1/en>
22. **Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. 1985.** *In vitro* cultivation-
of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res 46: 416-420.
23. **Zamora LM, Carretero C, Parés D. 2006.** Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. Food Sci Technol Int 12: 77-84. doi: 10.1177/1082013206062443