



XXII Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas

Orden Poster: CA-024 (ID: 437)

Autor: Del Río Alvarez, Florencia

Título: ENSAYOS DE LIOFILIZACIÓN DE ERITROCITOS Y SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE Babesia bovis

Director:

Palabras clave: liofilización, inmunoprofilaxis, babesiosis

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Evc - Cin

Periodo: 01/09/2015 al 31/08/2016

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Veterinarias

Proyecto: (13B016) Diseño y desarrollo de productos farmacéuticos para uso en medicina veterinaria. Control de calidad y eficacia clínica.

Resumen:

Los protozoarios intraeritrocitarios *Babesia bovis* y *B. bigemina* son los agentes causales de la babesiosis bovina, una enfermedad transmitida por la garrapata *Rhipicephalus microplus* que provoca importantes pérdidas económicas en la ganadería de nuestro país. 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 de *Babesia* spp. atenuadas en su patogenicidad, que garantizan un estado de fuerte protección inmunológica.

Existen en el mercado dos presentaciones de la vacuna para la profilaxis de esta enfermedad, fresca y ultracongelada, estas presentan ciertos inconvenientes en lo que respecta a la aplicación a campo, por lo que resultaría de gran relevancia la obtención de una tercera presentación en forma liofilizada. De este modo se propone en el presente trabajo ensayos para la liofilización de uno de los componentes de la vacuna antes mencionada.

Para lo cual se obtuvieron eritrocitos parasitados con *Babesia bovis* a partir de cultivo *in vitro*, se centrifugó a 2500 rpm, el paquete globular fue mezclado en partes iguales con una solución criopreservadora y se dispuso en viales conteniendo alícuotas de 5 ml. A fin de lograr la deshidratación y posterior reactivación de los eritrocitos parasitados y el sobrenadante de los cultivos, el material fue sometido a una curva de congelamiento previamente estandarizada. Cuando la temperatura alcanzó los -80°C los viales fueron trasladados, rápidamente, a termos de nitrógeno líquido hasta el proceso de liofilización.

Las muestras congeladas se transfirieron a un liofilizador de banco superior. Se dejaron que las muestras se deshidraten a fondo (6 a 24 horas) hasta que sean de aspecto cristalino y quebradizo al tacto y que el tubo vuelva a temperatura ambiente.

Los eritrocitos fueron reconstituidos con agua destilada, solución fisiológica, buffer fosfato y VyM, para la observación y determinación del porcentaje de recuperación de células, en fresco y en extendidos teñidos con Giemsa.

La reactivación de los eritrocitos parasitados liofilizados se realizó en una cámara de mezclas de gases.

Posteriormente se tomaron 100 μg de eritrocitos y SN y se disolvieron separadamente en 500 μl de solución VYM, y 10 μl de Tween 40 (1%). Luego, se cargaron con jeringa de tuberculina, 500 μl ; de adyuvante completo de Freund (Sigma) y se les agregó a la mezcla anterior de a gotas y agitando con vortex para que se formara una emulsión homogénea. Se realizaron tres lotes (n=4) de ratones machos de 4 meses de edad de la cepa BALB/c. Cada ratón fue inoculado por vía intraperitoneal con 200 μl de emulsión que contenía 20 μg de liofilizado total a de eritrocitos liofilizados, el segundo lote fue inoculado con SN liofilizados y al tercer se les administro solución fisiológica, y los diluyentes utilizados en la reconstitución de los liofilizados. A los 30 días de la primera inoculación se realizó una segunda, con 500 μl de adyuvante incompleto de Freund, siguiendo la misma preparación antes mencionada.

Luego de 60 días se obtuvieron muestras de sangre de todos los grupos de ratones y fueron enviadas al laboratorio de Biotecnología de INTA- Castelar para la titulación de anticuerpos por técnicas de enzimoimmunoensayos (ELISA).

Luego de la estandarización de los parámetros y tiempos del liofilizador se obtuvo un polvo adecuadamente deshidratado de los eritrocitos y el sobrenadante.

La reconstitución del paquete globular con los diferentes disolventes evidenció que solución fisiológica y agua destilada, presentaron un alto porcentaje de recuperación de células. En las condiciones de trabajo no se pudieron reactivar las cepas en la cámara de incubación con la mezcla de gases, se deberían ajustar las condiciones para lograr este propósito. En los ensayos de titulación de anticuerpos por técnicas de enzimoimmunoensayos se evidenció que los ratones inoculados con SN y eritrocitos liofilizados reconocen al multiantígeno de *Babesia bovis*. Estos resultados son promisorios para el desarrollo de una nueva alternativa de inmunoprofilaxis para la Babesiosis.