

La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo

The simultaneous vaccination of bovines with *Lactobacillus casei* and the bivalent vaccine against bovine babesiosis induces a better protection against *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by ticks in extreme field conditions

Carlos R. Bautista-Garfias* Roberto Castañeda-Arriola* Jesús A. Álvarez-Martínez*
Carmen Rojas-Martínez* Julio V. Figueroa-Millán* Astrid Rodríguez-Lozano***

Abstract

The effect of *Lactobacillus casei* on INIFAP's mixed vaccine against bovine babesiosis (VAC) was assessed in bovines in an endemic babesiosis area. It was previously reported that *L. casei* increases the efficiency of the Mexican mixed vaccine against bovine babesiosis under controlled conditions. The results of the present study demonstrated the effectiveness of simultaneous vaccination of bovines with *L. casei* and the mixed vaccine against bovine babesiosis in eliciting a protective immune response under extreme conditions in the field. Twenty *Babesia* spp free bovines were allocated into three groups: un-vaccinated (Control, n = 9), vaccinated with VAC (n = 5), and vaccinated simultaneously with VAC and *Lactobacillus casei* (LC-VAC, n = 6). All animals were kept in a tick and *Babesia* spp free field at Coatepec, Veracruz during 24 days before moving them to Paso del Toro, Veracruz, for a natural exposition to *Babesia* spp transmitted by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. Protection against *Babesia* spp was observed in bovines belonging to VAC and LC-VAC groups, while control animals showed severe clinical babesiosis. Bovines in VAC-LC group showed less clinical signs between days 12-16 after challenge as compared with animals in VAC group. All bovines showed both *Babesia* spp after challenge. Levels of IgG anti-*Babesia* in animals from both vaccinated groups, determined by indirect immunofluorescence test, always were higher to *Babesia bovis* than to *B. bigemina* after vaccination and challenge. It was demonstrated the efficiency of simultaneous vaccination of bovines with VAC and *L. casei*, in eliciting a better protective immune response against naturally transmitted *Babesia* spp under extreme field conditions.

Key words: BOVINE BABESIOSIS BIVALENT VACCINE, *LACTOBACILLUS CASEI*, EFFICACY, FIELD CHALLENGE.

Resumen

Se evaluó el efecto de *Lactobacillus casei* en la vacuna mixta contra babesiosis bovina del INIFAP (VAC), en bovinos de un área endémica de babesiosis. Previamente se informó que *L. casei* incrementa la eficacia de la vacuna mixta mexicana contra babesiosis bovina bajo condiciones controladas. Los resultados aquí expuestos demostraron dicha efectividad para generar una respuesta inmunitaria protectora bajo condiciones extremas en el campo. Veinte bovinos libres de *Babesia* spp fueron distribuidos al azar en tres grupos: testigo no vacunado (Testigo, n = 9), vacunado con VAC (n = 5), y vacunado simultáneamente con VAC y *L. casei* (LC-VAC, n = 6). Todos los animales se mantuvieron en un corral libre de garrapatas y *Babesia* spp en Coatepec, Veracruz durante 24 días antes de transportarlos a Paso del Toro, Veracruz, para una exposición natural a *Babesia* spp transmitida por garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus)*. Se observó protección contra *Babesia* spp en bovinos pertenecientes a los grupos VAC y LC-VAC, mientras que los animales testigo

Recibido el 22 de agosto de 2011 y aceptado el 27 de febrero de 2012.

*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534, col. Progreso, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

**C.E.P. La Posta, km 22.4, carretera Veracruz-Córdoba, Paso del Toro, Medellín de Bravo, 91700, Veracruz, México.

mostraron signos clínicos de babesiosis aguda. Los bovinos del grupo VAC-LC mostraron menos signos clínicos que los del grupo VAC entre los días 12-16. Todos los bovinos mostraron *Babesia* spp después de la confrontación. Los niveles de IgG anti-*Babesia* en los animales de los grupos vacunados, determinados por inmunofluorescencia indirecta, siempre fueron más elevados contra *Babesia bovis* que contra *B. bigemina* después de la vacunación y de la confrontación. Se demostró la eficacia de la vacunación simultánea con VAC y *L. casei* en bovinos, para generar una mejor respuesta inmunitaria protectora contra *Babesia* spp transmitida naturalmente por garrapatas, bajo condiciones extremas de campo.

Palabras clave: VACUNA BIVALENTE CONTRA BABESIOSIS BOVINA, *LACTOBACILLUS CASEI*, EFECTIVIDAD, CONFRONTACION DE CAMPO.

Introduction

One of the most important cattle parasitic diseases in the whole world is bovine babesiosis, disease provoked by protozoa of the *Babesia* genus.¹ In Mexico, 75% of the 23, 316,000 cattle heads² is in risk of acquiring babesiosis.³ In this sense, it is important to mention that, besides adults, clinical babesiosis cases have been documented recently in calves younger than nine months of age, born in endemic areas of the disease.⁴ At the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria de Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) from the Mexican government, an attenuated live vaccine against *Babesia bovis* and *B. bigemina*, which protects at least 80% of the vaccinated cattle against virulent *Babesia* strains⁵⁻⁷ and 70% of animals under extreme field conditions was developed.⁸

On the other hand, it has been proposed the use of the immunostimulant lactic-acid bacteria *Lactobacillus casei* as an alternative control measure of distinct parasitic diseases.⁹ In this context, it has been demonstrated that *L. casei*, by itself, induces protective responses against *Babesia microti* in mice when it is inoculated before or the same day of the challenge infection¹⁰ and against *Babesia bovis* and *B. bigemina* in cattle when the lactic-acid bacteria is administered before the mixed vaccine against bovine babesiosis under laboratory controlled conditions; however, *L. casei* alone did not induce protection against *Babesia* challenge in cattle.¹¹

In the present study, the protection effectiveness of *L. casei* administered at the same time that the Mexican mixed vaccine against bovine babesiosis was assessed in bovines which were first vaccinated and later exposed to a natural transmission of *Babesia bovis* and *B. bigemina* by the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* under extreme conditions in a natural endemic area of bovine babesiosis in the Mexican tropic (Paso del Toro, Veracruz, Mexico), considered as an endemic area of bovine babesiosis.¹²

Introducción

Una de las enfermedades parasitarias más importantes del ganado en todo el mundo es la babesiosis bovina, enfermedad producida por protozoarios del género *Babesia*.¹ En México, 75% de las 23,316,000 cabezas de ganado vacuno² están en riesgo de adquirir babesiosis.³ En este sentido, es importante señalar que, además de los adultos, recientemente se han documentado casos clínicos de babesiosis en becerros menores a nueve meses de edad, nacidos en áreas endémicas de la enfermedad.⁴ En el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria de Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del gobierno mexicano, se desarrolló una vacuna viva atenuada contra *Babesia bovis* y *B. bigemina*, que protege al menos a 80% de los bovinos vacunados contra cepas virulentas de *Babesia*⁵⁻⁷ y a 70% de los animales bajo condiciones extremas de campo.⁸

Por otro lado, se ha propuesto la utilización de la bacteria ácido-láctica inmunoestimulante *Lactobacillus casei* como una alternativa para el control de diferentes enfermedades parasitarias.⁹ En este contexto, se ha demostrado que *L. casei*, por sí misma, induce una respuesta protectora contra *Babesia microti* en ratones cuando es inoculada antes o el mismo día de la infección¹⁰ y contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* en ganado bovino, cuando la bacteria ácido-láctica es administrada antes de la vacuna mixta contra babesiosis bovina bajo condiciones controladas de laboratorio; sin embargo, *L. casei* sola no indujo protección en el ganado vacuno contra el desafío con *Babesia*.¹¹

En el presente estudio se evaluó la efectividad de la protección conferida por la administración simultánea de *L. casei* y la vacuna mixta contra babesiosis bovina en bovinos que después de vacunados fueron expuestos a la transmisión natural de *Babesia bovis* y *B. bigemina* por la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del ganado bajo condiciones extremas en Paso del Toro, Veracruz, México, considerada como área endémica de babesiosis bovina.¹²

Material and methods

This study was previously revised and approved in accordance with the official Mexican guidelines NOM-062-ZOO-1999, NOM-033-ZOO-1995 and NOM-051-ZOO-1995 by members of the subcommittee on the ethical and humanitarian use of animals of the CENID-PAVET collegiate technical group of INIFAP. All the bovines used in this experiment were housed, handled and fed by trained personnel according to the indicated guidelines.

Vaccine against bovine babesiosis

The bivalent attenuated vaccine against bovine babesiosis developed by INIFAP was used, which consists of a mixture of the attenuated *Babesia bigemina* BIS strain and of *B. bovis* BOR clone.⁸

Bacterial strain

The *Lactobacillus casei* ATCC7469 strain was aerobically cultured in MRS* at 37°C during 18 h. Then, the microorganisms were centrifuged at 5000 g for 10 min, and the precipitate was washed several times with sterile phosphate buffered solution (PBS); later the organisms were killed in boiling water during 30 min and the number of organisms in culture was adjusted to 10⁹ colony forming units (CFU)/ml of PBS.^{13,14}

Animals

Twenty crossbred Holstein x Swiss bovines, free of tuberculosis, brucellosis, babesiosis and anaplasmosis, with an average age of nine months, were allocated at random into three groups: Non-vaccinated: Control (n=9), immunized with the mixed vaccine against bovine babesiosis: VAC (n=5), and inoculated with VAC and *Lactobacillus casei*: LC-VAC (n=6).

Experimental design

Animals were allocated in the field at Coatepec (1250 meters above sea level, geographical coordinates: 19° 25' 0" North, 96° 47' 0" West), Veracruz, where they received the following treatments: animals in control group received 3 ml of sterile saline solution by intramuscular (i.m.) route in the right haunch; those in group VAC were immunized i.m. in the right haunch with 1 × 10⁸ infected erythrocytes of each *Babesia* species coming from *in vitro* cultures in a volume of 3 ml, and bovines in LC-VAC group were inoculated i.m. in two different sites: with VAC (3 ml) in the right

Material y métodos

Este estudio fue previamente revisado y aprobado de acuerdo con las normas oficiales mexicanas NOM-062-ZOO-1999, NOM-033-ZOO-1995 y NOM-051-ZOO-1995 por miembros del subcomité de uso ético y humanitario de animales del grupo técnico colegiado del CENID-PAVET del INIFAP. Todos los bovinos usados en este experimento fueron alojados, manejados y alimentados por personal entrenado de acuerdo con las normas indicadas.

Vacuna contra babesiosis bovina

Se utilizó la vacuna bivalente atenuada contra babesiosis bovina desarrollada por el INIFAP, que consiste en una mezcla de la cepa atenuada BIS de *Babesia bigemina* y la clona BOR de *B. bovis*.⁸

Cepa bacteriana

La cepa ATCC7469 de *Lactobacillus casei* se cultivó bajo condiciones aeróbicas en el medio MRS* a 37°C durante 18 h. Posteriormente, los microorganismos fueron centrifugados a 5000 g por 10 min, y el precipitado se lavó varias veces con solución salina amortiguadora estéril de fosfatos (PBS), más tarde, los organismos murieron por calor en agua hirviendo durante 30 min y el número de organismos en el cultivo se ajustó a 10⁹ unidades formadoras de colonias (CFU)/ml de PBS.^{13,14}

Animales

Veinte bovinos cruza Holstein x Suizo, libres de tuberculosis, brucelosis, babesiosis y anaplasmosis, con una edad promedio de nueve meses, fueron distribuidos al azar en tres grupos: no-vacunado: Testigo (n = 9), inmunizado con la vacuna mixta contra babesiosis bovina: VAC (n = 5), e inoculado con VAC y *Lactobacillus casei*: LC-VAC (n = 6).

Diseño experimental

Los animales se alojaron en un potrero en Coatepec, Veracruz, ubicado a 1250 metros sobre el nivel del mar; coordenadas geográficas: 19°25'0" Norte, 96°47'0" Oeste, donde recibieron los siguientes tratamientos: los animales del grupo Testigo recibieron 3 ml de solución salina estéril vía intramuscular (im) en el anca derecha; los del grupo VAC fueron inmunizados vía im en el anca derecha con 1 × 10⁸ eritrocitos infectados con cada una de las especies de *Babesia* del

*De Man, Rogosa y Sharpe; Merck, Darmstadt, Alemania.

haunch and with *Lactobacillus casei* (3×10^9 CFU) in a volume of 2 ml, in the left haunch. Then, they were kept under observation for 24 days before transportation to Paso del Toro, Veracruz (10 meters above sea level, geographical coordinates: 19°2'0" North, 96°7'0" West) a bovine babesiosis endemic area with estimated bovine babesiosis prevalence higher than 90%,¹² where they were exposed in the field to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks naturally infected with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. This situation was denominated "extreme field conditions" which was defined as: the sum of tropical climate conditions, summertime, heavy tick infestation, and hyper endemic babesiosis area.

Record of temperature, packed cell volume (hematocrit), Babesia parasitized erythrocytes and IgG anti-Babesia antibody levels

At Paso del Toro, Veracruz, the following parameters were recorded daily: rectal temperature (°C) and packed cell volume (PCV, as percentage). Blood smears were prepared daily from days five to 14 after challenge (ac) and stained with Giemsa to determine, by optic microscopic evaluation, the presence of *Babesia* spp and the percentage of parasitized erythrocytes (PPE). At the same time, sera were obtained from the bovines at days 0, 17 after vaccination (av) and days eight and 20 ac to establish anti-*Babesia bigemina* and anti-*B-bovis* antibody levels by the indirect fluorescent antibody test (IFAT).¹⁵

Criterion to assess acute babesiosis

An animal was considered with acute babesiosis (which required treatment to avoid death) when all the following parameters were present: 1) non-vaccinated against bovine babesiosis, 2) reduction of PCV above 25% of the basal value, 3) rectal temperature higher than 40°C during two days in a row and 4) presence of *Babesia* spp. in stained blood smears.^{5-8,11} Besides, it was taken into account the poor physical condition of animals (not measurable).

Assessment of babesiosis clinical signs and acute babesiosis with death risk

Similarly, percentages of clinical signs of babesiosis and acute babesiosis were assessed as follow:

- The percentage of clinical signs babesiosis = number of animals with fever and presence of parasites

cultivo *in vitro* en un volumen de 3 ml, y los bovinos del grupo LC-VAC fueron inoculados vía im en dos sitios diferentes: con VAC (3 ml) en el anca derecha y con *Lactobacillus casei* (3×10^9 u.f.c.) en un volumen de 2 ml, en el anca izquierda. Luego se mantuvieron en observación 24 días antes de transportarlos a Paso del Toro, Veracruz (10 metros sobre el nivel del mar, coordenadas geográficas: 19°2'0" Norte, 96°7'0" Oeste), un área endémica de babesiosis bovina con una prevalencia estimada de babesiosis bovina mayor a 90%,¹² donde fueron expuestos en el campo a garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* naturalmente infectadas con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Esta situación se denominó "condiciones extremas de campo", definidas como la suma de condiciones de clima tropical, tiempo de verano, severa infestación de potreros con garrapatas y área endémica de babesiosis bovina.

Registro de temperatura, volumen celular aglomerado (hematocrito), eritrocitos parasitados con Babesia y niveles de anticuerpos IgG anti-Babesia

En Paso del Toro, Veracruz, se registraron diariamente los siguientes parámetros: temperatura rectal (°C) y volumen celular aglomerado (PCV, como porcentaje). Se prepararon frotis sanguíneos diariamente desde el día 14 después de la confrontación (dc), teñidos con Giemsa para determinar por evaluación microscópica óptica la presencia de *Babesia* spp y el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP). Al mismo tiempo, se obtuvieron sueros de los bovinos los días 0 y 17 después de la vacunación (dv) y los días ocho y 20 dc para determinar los niveles de anticuerpos IgG anti-*Babesia bigemina* y anti-*B-bovis* por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).¹⁵

Criterio para determinar babesiosis aguda

Un animal fue considerado con babesiosis aguda (requiriendo tratamiento para evitar la muerte) cuando mostró los siguientes parámetros: 1) No vacunado contra babesiosis bovina; 2) Más de 25% de reducción del volumen celular aglomerado (VCA) con respecto al valor basal; 3) Temperatura rectal mayor a 40°C durante dos días seguidos; y 4) Presencia de *Babesia* spp en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa.^{5-8,11} Además, se tomó en cuenta la pobre condición física del animal (no medible).

in Giemsa stained blood smears in the group/total number of animals in the group $\times 100$.

- The percentage of acute babesiosis with the risk of death = number of animals in the group that showed fever, PCV reduction above 25% of the basal value and presence of parasites in Giemsa stained blood smears /total number of animals in the group $\times 100$.

It is important to point out that, in contrast with previous studies, experimental bovines in the control group were treated against *Babesia* with 4,4'-(diamino)dibenzamide diacetate* (Ganaseg) when they showed acute babesiosis signs after challenge to avoid their death.⁶⁻⁸

Statistical analysis

Statistical significance of differences was determined from means $\pm$ standard deviation (SD) by analysis of variance (ANOVA), with the experimental design software.¹⁶

Results

Temperature

From the clinical point of view, the animals in VAC-LC group showed a better performance as compared with the bovines in VAC group, particularly in the period of time of seven days, from day 14 to day 20 ac. In this period, the mean rectal temperature value ($\pm$ SE) was significantly higher ($P < 0.05$) in the animals belonging to VAC group (40 ± 0.08 °C) as compared with those bovines from LC-VAC group (39.5 ± 0.1 °C) (Figure 1).

Packed cell volume (PCV)

At day 0 no significant differences were observed among groups. At day 15 ac the mean percentage of PCV in the control group was significantly lower (16.6%, $P < 0.05$) than the values observed in VAC (21.5%) and LC-VAC (22.3%) groups, representing a 52.4% drop with respect to the basal value (day 0). On days 16 and 17 PCV was significantly different in vaccinated groups as compared with control group ($P < 0.05$) (Figure 2).

Percentage of parasitized erythrocytes (PPE)

At day 10 ac, *Babesia* spp was observed in stained blood smears, only in levels of PPE below 0.01; then the values increased, and at days 12 and 14 ac, a significant difference ($P < 0.01$) in the mean PPE values was ob-

Evaluación de signos clínicos de babesiosis y babesiosis aguda con riesgo de muerte

Similarmente, los porcentajes de signos clínicos de babesiosis y babesiosis aguda se determinaron de la siguiente manera:

- El porcentaje de signos clínicos de babesiosis = número de animales con fiebre y presencia de parásitos en frotis teñidos con Giemsa en el grupo/número total de animales en el grupo $\times 100$.
- El porcentaje de babesiosis aguda con riesgo de muerte = número de animales en el grupo que mostraron fiebre, reducción de más de 25% del valor basal del VCA y presencia de parásitos en frotis teñidos con Giemsa /número total de animales en el grupo $\times 100$.

Es importante señalar que, en contraste con estudios previos, los bovinos experimentales en el grupo Testigo se trataron contra *Babesia* con 4,4'-(diamino)dibenzamide diacetate* (Ganaseg) cuando mostraron signos clínicos de babesiosis aguda después de la confrontación, para evitar su muerte.⁶⁻⁸

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias se determinó de las medias $\pm$ desviación estándar (DE) por medio del análisis de varianza (ANDEVA) con el software Paquete de diseños experimentales.¹⁶

Resultados

Temperatura

Desde el punto de vista clínico, los animales del grupo VAC-LC mostraron un mejor desempeño en comparación con los bovinos del grupo VAC, particularmente en el periodo de siete días, que abarcó del día 14 al día 20 dc. En este periodo, el promedio de la temperatura rectal ($\pm$ EE) fue significativamente más alto ($P < 0.05$) en los animales del grupo VAC (40 ± 0.08 °C), en comparación con los bovinos del grupo LC-VAC (39.5 ± 0.1 °C) (Figura 1).

Volumen celular aglomerado (VCA)

En el día 0 no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los grupos. Al día 15 dc el porcentaje promedio de VCA en el grupo no-vacunado (Testigo) fue significativamente más bajo (16.6%, $P < 0.05$), comparativamente con los valores observados

*NOVARTIS Salud Animal México S.A. de C.V.

served in LC-VAC group as compared to those values of VAC and control groups. At day 12 ac, the PPE values (mean $\pm$ SE) were $0.13\% \pm 0.05$ for LC-VAC group; $0.53\% \pm 0.04$ for VAC group, and $0.43\% \pm 0.12$ for control group; while the values observed at day 14 ac were $0.10\% \pm 0.05$ for LC-VAC group, $0.46\% \pm 0.02$ for VAC group, and $0.45\% \pm 0.12$ for control group (Figure 3).

IgG anti-Babesia antibody levels

The mean IgG anti-*Babesia* antibody levels in both groups of vaccinated animals were always higher to *B. bovis* than to *B. bigemina*, after vaccination and after challenge. At day eight ac, the mean antibody levels to *B. bigemina* were higher in LC-VAC group than in VAC group (Figure 4a). Similarly at day 17 av, the mean antibody levels to *B. bovis* was higher in VAC group compared with that observed in LC-VAC group; while that at day 20 ac, the mean antibody levels to *B. bovis* were higher in LC-VAC group than in VAC group (Figure 4b); however, no significant differences were observed. In control group the mean anti-*Babesia* antibody levels were very low ac as compared with those means of LC-VAC and VAC groups.

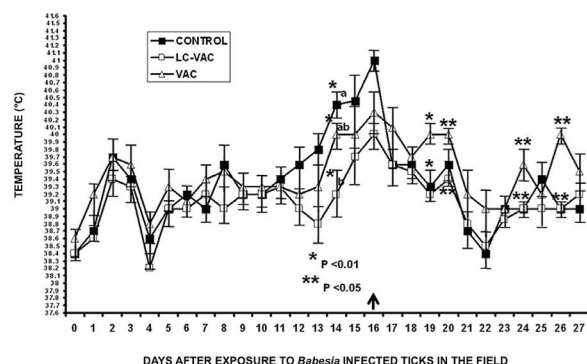


FIGURA 1. Temperatura promedio (°C) en tres grupos de bovinos expuestos a *Babesia* spp transmitida por *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en el campo. Cada punto representa la media $\pm$ E.E. de nueve (Testigo), seis (*Lactobacillus casei* + vacuna mixta contra babesiosis: LC-VAC), y cinco bovinos (vacuna contra babesiosis: VAC). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$) entre el grupo LC-VAC y los grupos Testigo o VAC. Se administró tratamiento anti-*Babesia* a los animales Testigo el día 16 (flecha).

FIGURE 1. Average temperature (°C) in three groups of bovines exposed to *Babesia* spp transmitted by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in the field. Each point represents the mean $\pm$ SE of nine (control), six (*Lactobacillus casei* + mixed vaccine against babesiosis: LC-VAC), and five bovines (vaccine against babesiosis: VAC). Asterisks indicate significant differences (* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$) between LC-VAC group and control or VAC groups. Anti-*Babesia* treatment was administered to the control animals at day 16 (arrow).

en los grupos VAC (21.5%) y LC-VAC (22.3%), y representó una disminución de 52.4% con respecto al valor basal (día 0). Los días 16 y 17, el VCA fue significativamente diferente en los grupos vacunados, en comparación con el grupo Testigo ($P < 0.05$) (Figura 2).

Porcentaje de eritrocitos parasitados PEP

El día 10 dc se observó *Babesia* spp en los frotis sanguíneos teñidos sólo en niveles inferiores a 0.01 PEP; luego los valores se incrementaron, y los días 12 y 14 dc, se registró una diferencia significativa ($P < 0.01$) en los valores promedio de PEP observados en el grupo LC-VAC en comparación con los valores de los grupos VAC y Testigo. Al día 12, los valores de PEP (promedio $\pm$ EE) fueron de $0.13\% \pm 0.05$ para el grupo LC-VAC; $0.53\% \pm 0.04$ para el grupo VAC, y $0.43\% \pm 0.12$ para el grupo Testigo; mientras que los valores observados el día 14 dc fueron de $0.10\% \pm 0.05$ para el grupo LC-VAC, $0.46\% \pm 0.02$ para el grupo VAC, y $0.45\% \pm 0.12$ para el grupo Testigo (Figura 3).

Niveles de anticuerpos IgG anti-Babesia

El promedio de los niveles de anticuerpos IgG anti-*Babesia* en ambos grupos de animales vacunados siempre

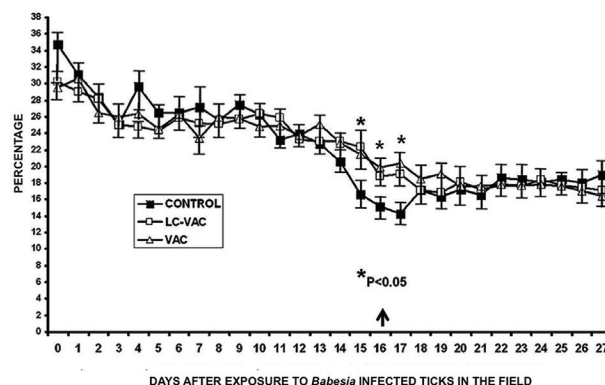


FIGURA 2. Porcentaje promedio del volumen celular aglomerado (PCV) en tres grupos de bovinos expuestos a *Babesia* spp transmitida por *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en el campo. Cada punto representa la media $\pm$ E.E. de nueve (Testigo), seis (*Lactobacillus casei* + vacuna mixta contra babesiosis: LC-VAC) y cinco bovinos (vacuna contra babesiosis: VAC). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el grupo LC-VAC y los grupos Testigo o VAC. Se administró tratamiento anti-*Babesia* a los animales Testigo el día 16 (flecha).

FIGURE 2. Mean percentage of the packed cell volume (PCV) in three groups of bovines exposed to *Babesia* spp transmitted by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in the field. Each point represents the mean $\pm$ SE of nine (control), six (*Lactobacillus casei* + mixed vaccine against babesiosis: LC-VAC), and five bovines (vaccine against babesiosis: VAC). Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between LC-VAC group and control or VAC groups. Anti-*Babesia* treatment was administered to the control animals at day 16 (arrow).

Babesiosis clinical signs and acute babesiosis with death risk

Clinical signs of babesiosis (mainly fever) were observed at day 16 ac in nine out of nine animals (100%) of the control group, in six out of six bovines (100%) of the VAC group and in three out of six animals (50%) of the LC-VAC group; while signs of acute babesiosis with risk of death were observed in nine out of nine bovines (100%) of the control group and in none of six or five animals (0%) of the LC-VAC and VAC groups, respectively. At this day, all animals of the control group showed both *B. bovis* and *B. bigemina* in their stained blood smears when examined by the optic microscope. At day 16 ac, three out of nine control animals were lying on their bellies, while all bovines from vaccinated groups showed a natural standing position. At this day, the animals of the control group were treated against babesiosis with 4,4'-(diamino) dibenzamide diacetate* (Ganaseg) during two days in a row; however, at day 26 ac one animal died. Vac-

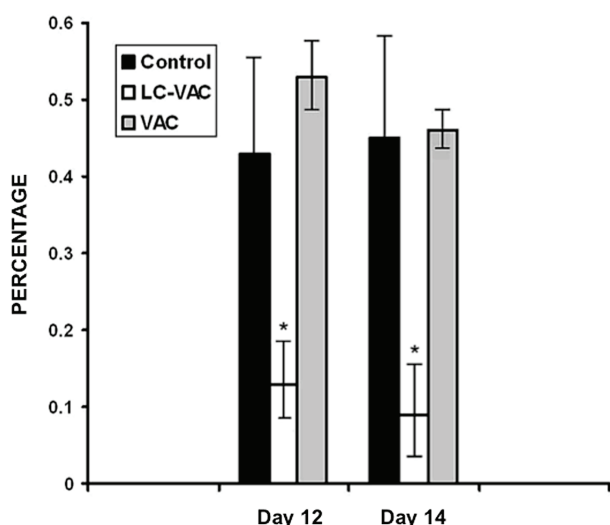


FIGURA 3. Porcentaje promedio de eritrocitos parasitados por *Babesia* spp determinado por el examen al microscopio de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, los días 12 y 14 después de la exposición de los tres grupos de bovinos a *Babesia* spp transmitida por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el campo. Cada punto representa la media $\pm$ E.E. de nueve (Testigo), seis (*Lactobacillus casei* + vacuna mixta contra babesiosis: LC-VAC), y cinco bovinos (vacuna contra babesiosis: VAC). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.01$) entre el grupo LC-VAC y los grupos Testigo o VAC.

FIGURE 3. Mean percentage of *Babesia* spp parasitized erythrocytes as determined by the assessment of Giemsa stained blood smears at days 12 and 14 after exposure of the three bovine groups to *Babesia* spp transmitted by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the field. Each point represents the mean $\pm$ SE of nine (control), six (*Lactobacillus casei* + mixed vaccine against babesiosis: LC-VAC), and five bovines (vaccine against babesiosis: VAC). Asterisks indicate significant differences ($P < 0.01$) between LC-VAC group and control or VAC groups.

fue más alto contra *B. bovis* que contra *B. bigemina*, después de la vacunación y después de la confrontación. Al día ocho dc, el promedio de los niveles de anticuerpos contra *B. bigemina* fue más alto en el grupo LC-VAC que en el grupo VAC (Figura 4a). Similarmente, el día 17 dv, el promedio de los niveles de anticuerpos contra *B. bovis* fue más alto en el grupo VAC en comparación con el grupo LC-VAC; mientras que el día 20 dc el promedio de los niveles de anticuerpos contra *B. bovis* fue más alto en el grupo LC-VAC que en el grupo VAC (Figura 4b); sin embargo, no se observaron diferencias significativas. En el grupo Testigo el promedio de los niveles de anticuerpos anti-*Babesia* dc fue muy bajo, comparado con los promedios de los grupos LC-VAC y VAC.

Signos clínicos de babesiosis y de babesiosis aguda con riesgo de muerte

Se observaron signos clínicos de babesiosis (principalmente fiebre) el día 16 dc en los nueve animales (100%) del grupo Testigo, en los seis bovinos (100%) del grupo VAC y en tres de seis animales (50%) del grupo LC-VAC; mientras que se observaron signos de babesiosis aguda con riesgo de muerte en los nueve bovinos (100%) del grupo Testigo pero en ninguno de los animales (0%) de los grupos LC-VAC y VAC. El mismo día, todos los animales del grupo Testigo mostraron tanto *B. bovis* como *B. bigemina* en sus frotis sanguíneos teñidos con Giemsa al ser examinados con el microscopio óptico. Al día 16 dc, tres de nueve animales no vacunados estaban echados, mientras que todos los bovinos de los grupos vacunados estaban de pie. Ese mismo día, todos los animales en el grupo Testigo fueron tratados contra babesiosis con 4,4'-(diamino) dibenzamide diacetate* (Ganaseg) durante dos días consecutivos; a pesar del tratamiento, el día 26 dc un animal murió. Los animales vacunados (grupos LC-VAC y VAC) no recibieron tratamiento contra babesiosis. El día 20 dc todos los animales fueron tratados contra garrapatas (baño garrapaticida). Los bovinos mostraron cargas promedio de 2000 garrapatas (oscilando entre 1500 a 3000 garrapatas por animal). Un ejemplo de la carga de garrapatas se muestra en la Figura 5.

Discusión

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de *L. casei* inoculado simultáneamente con la vacuna mixta contra babesiosis bovina, para incrementar la eficiencia de dicha vacuna en animales (aun en menores

*NOVARTIS Salud Animal México S.A. de C.V.

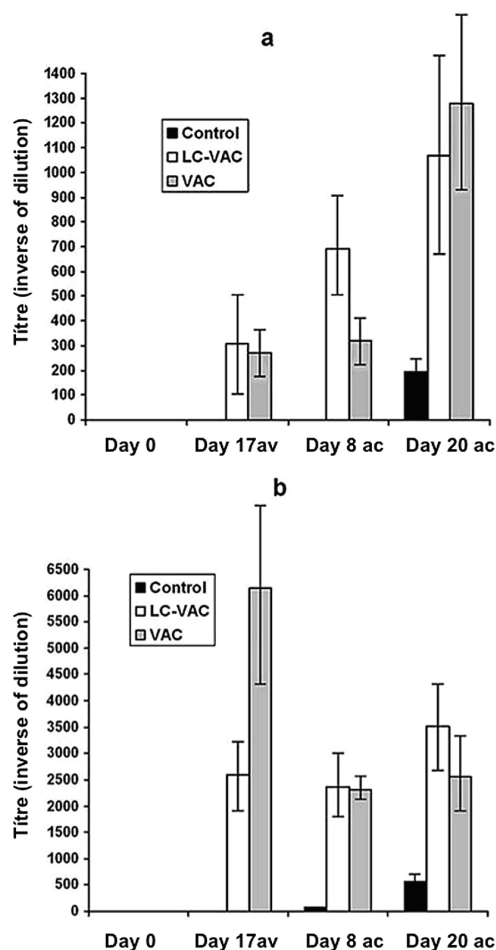


FIGURA 4. Promedio de los niveles de anticuerpos IgG anti-*Babesia*, determinados por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT), los días 0 (valores basales) y 17 después de la vacunación (dv) y a los ocho y 20 después de la confrontación (dc), de tres grupos de bovinos con *Babesia* spp transmitida por *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en el campo. Cada punto representa la media $\pm$ E.E. de nueve (Testigo), seis (*Lactobacillus casei* + vacuna mixta contra babesiosis: LC-VAC), y cinco bovinos (vacuna contra babesiosis: VAC). **a)** IgG anti-*Babesia bigemina*; **b)** IgG anti-*Babesia bovis*.

FIGURE 4. Mean levels of IgG anti-*Babesia* antibodies as determined by the indirect fluorescent antibody test (IFAT), at days 0 (basal values) and 17 after vaccination (av) and at eight and 20 after challenge (ac), of three bovine groups with *Babesia* spp transmitted by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in the field. Each point represents the mean $\pm$ SE of nine (control), six (*Lactobacillus casei* + mixed vaccine against babesiosis: LC-VAC), and five bovines (vaccine against babesiosis: VAC). **a)** IgG anti-*Babesia bigemina*; **b)** IgG anti-*Babesia bovis*.

cinated animals (LC-VAC and VAC) did not receive treatment against babesiosis. At day 20 ac, all animals were treated against ticks (anti-tick bath). Bovines showed average tick loads of 2000 (ranging from 1500 to 3000 ticks per animal). An example of cattle tick load is shown in Figure 5.



FIGURA 5. Vista posterior de un bovino mostrando la carga de garrapatas el día 20 después de la introducción a un potrero infestado con *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en La Posta Veracruz, México.

FIGURE 5. Rear view of a bovine showing tick load at day 20 after moving to a paddock infested with *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* at La Posta Veracruz, México.

de nueve meses de edad) expuestos a la confrontación natural con *B. bovis* y *B. bigemina* transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* del ganado, y corroboraron los hallazgos previos observados en bovinos vacunados y confrontados bajo condiciones controladas con *Babesia bovis* y *B. bigemina*.¹¹ En el estudio de Bautista *et al.*¹⁰ no se observó protección contra la confrontación con *Babesia* spp en bovinos tratados únicamente con *L. casei*. Con base en esa observación, en el presente estudio no se incluyó un grupo de bovinos tratados solamente con *L. casei*. Similarmente, los resultados sugieren que los bovinos del grupo VAC-LC están mejor protegidos contra la infección natural con *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas, que aquéllos que solamente recibieron la vacuna contra babesiosis. Se cree que los incrementos en el promedio de temperatura observados los días 24 y 26 en el grupo VAC, se pudieron deber a una reinfección con *Babesia* que luego fue controlada. Se sabe que *L. casei* estimula el sistema inmunitario innato por medio de la activación de receptores tipo-Toll (Toll-like receptors,

Discussion

The results obtained demonstrated the ability of *L. casei* inoculated simultaneously with the Mexican mixed bovine babesiosis vaccine to enhance the efficiency of this vaccine in animals exposed to a natural challenge with *B. bovis* and *B. bigemina* transmitted by the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, and corroborate the previous findings observed in vaccinated bovines and challenged with *Babesia bovis* and *B. bigemina* under controlled conditions.¹¹ In the study of Bautista *et al.*¹⁰ no protection against *Babesia* spp. challenge was observed in bovines treated with *L. casei* alone. Based on that finding, in the present study, a group treated only with *L. casei* was not included. Similarly, the results suggest that the bovines of VAC-LC group are better protected against the natural infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* than those which only received the bovine babesiosis vaccine alone. It is believed that the spikes in temperature observed on days 24 and 26 for the VAC group may have been caused by a reinfection with *Babesia*, which was controlled later. It is known that *L. casei* stimulates the innate immune system through activation of Toll-like receptors (TLRs) and production of Th1 type cytokines.^{17,18} TLRs not only induce innate immune responses, but also modulate cellular and humoral adaptive immunity, which give rise to a better acquired immune response to a particular antigen, such as those of vaccines.^{19,20} In this respect, it has been shown that a protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes in cattle.^{21,22}

The results observed in the present study suggest that the use of *L. casei* in vaccines against bovine babesiosis might mitigate the severe responses to vaccination observed in vaccinated cattle.²³

It is probable that the immune response elicited by *L. casei* and the vaccine against babesiosis in this study, consisted in a combination of both arms of the immune response: cellular and humoral; however, the cellular mechanisms should be investigated with more detail in future studies.

Low mean temperature observed in the period of time of seven days after field exposure (days 14-20), was probably due to the presence of less parasites in animals in LC-VAC group (39.5°C) as compared with that observed in bovines of VAC group (40°C).

The drop in PCV (particularly at days 15, 16, and 17) was caused mainly in bovines belonging to control group by the infection with both species of *Babesia* and the severe tick infestation (Figure 5), while that observed in animals of LC-VAC and VAC groups was probably caused by the tick infestation alone.

TLRs) y la producción de citocinas tipo Th1.^{17,18} Los TLRs no solamente inducen respuestas inmunitarias innatas, sino que también modulan la respuesta inmunitaria adaptativa celular y humoral que da lugar a una mejor respuesta inmunitaria adquirida a un antígeno en particular, como los antígenos de las vacunas.^{19,20} En este sentido, se ha demostrado que una vacuna protectora de *Leptospira borgpetersenii* muerta induce una potente inmunidad Th1 que comprende respuestas mediadas por linfocitos T CD4 y T $\gamma\delta$ T en el ganado vacuno.^{21,22}

Los resultados observados en el presente estudio sugieren que el uso de *L. casei* en vacunas contra babesiosis bovina podría disminuir las severas respuestas a la vacunación que se observan en el ganado vacunado.²³

Es probable que la respuesta inmunitaria generada en este estudio por *L. casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis consistió en una combinación de ambos brazos de la respuesta inmunitaria, celular y humoral; sin embargo, los mecanismos celulares deben ser investigados con más detalle en estudios futuros.

El bajo promedio de temperatura observado en el periodo de siete días después de la exposición en el campo (días 14-20) probablemente se debió a la menor presencia de parásitos en los animales del grupo LC-VAC (39.5°C), en comparación con lo observado en los bovinos del grupo VCA (40°C).

La caída en el VCA (particularmente durante los días 15, 16 y 17) se observó principalmente en los bovinos del grupo Testigo por la infección de ambas especies de *Babesia* y la severa infestación por garrapatas (Figura 5), mientras que la observada en los animales de los grupos LC-VAC y VAC probablemente fue causada por la sola infestación de garrapatas.

El PEP mostrado por los animales del grupo VAC, similar al de los bovinos del grupo Testigo, sugiere que *Babesia* spp fue finalmente controlada; sin embargo, los parásitos atenuados de la vacuna sola generaron una respuesta protectora en los animales vacunados, pero incapaz de evitar los signos clínicos temporales causados por las cepas virulentas provenientes de la infección natural.

El bajo PEP observado en los bovinos del grupo LC-VAC en comparación con los valores mostrados en los animales de los grupos Testigo y VAC probablemente se debió a la estimulación de una mejor respuesta inmunitaria que controló la infección por *Babesia* con mayor eficacia. En este contexto, es probable que la respuesta inmunitaria innata fue activada por *L. casei*, como se ha demostrado en las infecciones por *B. microti*.¹⁰ Similarmente, se ha demostrado que es importante la estimulación apropiada de la respuesta inmunitaria innata en becerros, que involucra la inducción de citocinas Th1 y de células tipo-NK en el bazo, para el

The PPE showed by animals of VAC group, similar to those values of bovines in control group, suggests that the *Babesia* spp. were eventually controlled in the former and not in the latter; however, these attenuated parasites were able to cause temporary mild clinical signs in vaccinated cattle.

The low PPE observed in bovines of LC-VAC group compared with the values shown in animals of control and VAC groups was most likely due to the stimulation of a better immune response which controlled *Babesia* infection more efficiently. In this context, it is probably that the innate immune response was activated by *L. casei* as it has been demonstrated in *B. microti* infections.¹⁰ Similarly, it has been shown that the appropriate stimulation of innate immune response in calves is important, which involves Th1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen, for the control of *B. bovis* transmitted by *R. (Boophilus) microplus* cattle ticks.²⁴

Although the production of anti-*Babesia* antibodies in the animals of this study as manifestation of the immune response was only recorded, it is feasible that the cellular immunity was also involved in the control of *B. bovis* and *B. bigemina* in vaccinated animals as it has been previously suggested.^{11,25,26}

It is speculated that differences in the mean levels of anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* antibody levels in sera from vaccinated animals, were probably the result of different IgG sub-classes stimulated by treatments; that is, the simultaneous treatment with *L. casei* and the vaccine stimulated different IgG subclasses, unlike the treatment with the bovine babesiosis vaccine alone. However, more studies are required in this context.

It is important to point out that all animals in the three groups were kept in the field infested with ticks, up to 16 days after the anti-*Babesia* treatment in control group, period of time in which a drop in PCV was noticed in all animals. In this respect, it must be taken into account the direct effect of the massive tick infestation in animals which also induces, besides anemia, depression of the bovine immune system,^{27,28} which in turn may give rise to the acquisition of *Babesia* re-infection or other infections (viral, bacterial, fungal) in weak animals; for this reason it is mandatory to carry out tick control measures, in addition to the vaccination against *Babesia* spp. The present results are in agreement with recent studies in which it has been indicated that for better vaccines, pathogen-associated molecular patterns can be used to induce innate immune responses, via Toll-like receptors, that promote adaptive immunity.²⁹ In this context, the finding that clinical cases of babesiosis can be observed in unvaccinated calves younger than 9 months, born in an endemic area of the disease⁴ and the results of the present study suggest that *L. casei* may provide added protection, in adults and calves, to the live attenuated

control de *B. bovis* transmitida por garrapatas *R. (Boophilus) microplus*.²⁴

Aunque sólo se registró la producción de anticuerpos IgG anti-*Babesia* en los animales de este estudio como manifestación de la respuesta inmunitaria, es probable que la inmunidad celular haya estado también involucrada en el control de *B. bovis* y *B. bigemina* en los animales vacunados, como se ha sugerido anteriormente.^{11,25,26}

Se especula que las diferencias en los promedios de los niveles de anticuerpos IgG anti-*B. bovis* y anti-*B. bigemina* en los sueros de los animales vacunados en este sentido, posiblemente se debieron a diferentes subclases de IgG estimuladas por los tratamientos; es decir, el tratamiento simultáneo con *L. casei* y la vacuna contra babesiosis estimuló diferentes subclases de IgG, a diferencia del tratamiento con la vacuna sola. Sin embargo, se requiere llevar a cabo más estudios en este sentido.

Es importante señalar que todos los animales en los tres grupos fueron mantenidos en el potrero infestado con garrapatas hasta por 16 días después de que se aplicó el tratamiento anti-*Babesia* en los animales del grupo Testigo, periodo en el cual se observó una disminución en el VCA en todos los animales. Respecto a ello, debe tomarse en cuenta que el efecto directo de la infestación masiva con garrapatas en los animales, que causa anemia y supresión del sistema inmunitario de los bovinos,^{27,28} puede dar lugar a reinfecciones con *Babesia* u otras infecciones (virales, bacterianas, fúngicas) en animales débiles; por esta razón, es vital llevar a cabo medidas de control de garrapatas, además de la vacunación contra *Babesia* spp en zonas endémicas de babesiosis. Los resultados del presente estudio concuerdan con investigaciones recientes en las cuales se ha indicado que para mejorar las vacunas, los patrones moleculares asociados con patógenos pueden ser utilizados para inducir respuestas inmunitaria innatas, vía receptores tipo-Toll, que promueven la inmunidad adaptativa.²⁹ En este contexto, la observación reciente de que casos clínicos de babesiosis se pueden presentar en becerros menores de nueve meses de edad no-vacunados de una zona endémica de babesiosis⁴ y los resultados del presente trabajo, sugieren que el uso de *L. casei* puede proporcionar protección adicional a la vacuna bivalente contra babesiosis bovina, tanto en bovinos adultos como en becerros, contra la infección por *Babesia* en explotaciones localizadas bajo condiciones tropicales donde la babesiosis bovina generalmente es endémica.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que: 1) la eficacia de la administración simultánea de *L. casei* y la vacuna mixta mexicana contra babesiosis bovina fue mejor que la de la vacuna sola, en términos de presentación de signos clínicos de la enfermedad

vaccine against *Babesia* infection in farms located in tropical conditions where bovine babesiosis is usually endemic.

On the basis of the results obtained, it is concluded that: 1) the efficacy of the simultaneous administration of *L. casei* and the Mexican mixed vaccine against bovine babesiosis was better than the vaccine alone, in terms of presentation of clinical signs after exposure of vaccinated animals to a massive natural infestation with ticks infected with *B. bigemina* and *B. bovis* in an endemic area of bovine babesiosis; 2) the simultaneous administration of *L. casei* and the Mexican mixed vaccine against bovine babesiosis induces protection in the vaccinated animals similar to that observed in bovines treated with *L. casei* two days before the administration of the Mexican mixed vaccine against bovine babesiosis; 3) more studies are needed to elucidate the mechanisms which operate in animals vaccinated with *L. casei* and the bivalent vaccine against bovine babesiosis; 4) it was observed that less than nine months old animals non-vaccinated against bovine babesiosis, develop acute babesiosis when they are exposed to a heavy infestation with *B. bovis* and *B. bigemina* infected ticks.

Acknowledgements

This study was supported with funds from project number 6216955P of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Referencias

1. HUNFELD KP, HILDEBRANDT A, GRAY JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol* 2008;38:1219-1237.
2. INEGI. Estados Unidos Mexicanos. Censo Agropecuario 2007, VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal. Aguascalientes, Ags., México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2009.
3. MOSQUEDA JJ. Vacunas contra hemoparásitos en bovinos: Avances y perspectivas. En: BAUTISTA GARFIAS CR, FIGUEROA MILLÁN JV, editores. Perspectivas de control de parásitos de importancia veterinaria. CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP, Publicación Técnica número 2. 2004;6-12.
4. OJEDA JJ, OROZCO L, FLORES R, ROJAS C, FIGUEROA JV, ALVAREZ JA. Validation of an attenuated live vaccine against babesiosis in native cattle in an endemic area. *Transb Emerg Dis* 2010;57:84-86.
5. CANTO GJ, FIGUEROA JV, ALVAREZ JA, VEGA CA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Tec Pecu Mex* 1996;34:127-135.
6. FIGUEROA JV, CANTO GJ, ALVAREZ JA, LONA GR, RAMOS JA, VEGA CA. Capacidad protectora en

después de la exposición de animales vacunados a una infestación masiva con garrapatas infectadas con *B. bigemina* y *B. bovis* en un área endémica de babesiosis bovina; 2) la administración simultánea de *L. casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una protección en los animales vacunados contra la infección natural por *Babesia*, similar a la observada en bovinos tratados con *L. casei* dos días antes de la administración de la vacuna bivalente contra babesiosis bovina; 3) se requiere de más estudios para dilucidar los mecanismos que ocurren en los animales vacunados con *L. casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina; 4) los animales menores de nueve meses de edad no vacunados contra babesiosis, desarrollan babesiosis aguda cuando se exponen a una infestación masiva con garrapatas infectadas con *B. bovis* y *B. bigemina*.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado con fondos del proyecto número 6216955P del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Tec Pecu Méx* 1998;36:95-107.

7. ALVAREZ JA, RAMOS AJ, ROJAS E, MOSQUEDA JJ, VEGA MCA, OLVERA A *et al.* Field challenge of cattle vaccinated with a combined *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* frozen immunogen. *Ann NY Acad Sci* 2004;1026:277-283.
8. CANTO GJ, ROJAS EE, ALVAREZ JA, RAMOS JA, MOSQUEDA JJ, VEGA CA *et al.* Protection against bovine babesiosis with a mixed *in vitro* culture derived *B. bovis* and *B. bigemina* vaccine under a field challenge. Immunization in an endemic area. *Tec Pecu Méx* 2003;41:307-315.
9. BAUTISTA GARFIAS CR. Inmunoestimulación con *Lactobacillus casei* como alternativa para el control de enfermedades parasitarias. En: BAUTISTA GARFIAS CR, FIGUEROA MILLÁN JV, editores. Perspectivas de control de parásitos de importancia veterinaria. CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP, Publicación Técnica número 2. 2004:19-27.
10. BAUTISTA-GARFIAS CR, GOMEZ MB, AGUILAR BR, IXTA O, MARTINEZ F, MOSQUEDA J. The treatment of mice with *Lactobacillus casei* induces protection against *Babesia microti* infection. *Parasitol Res* 2005; 97:472-427.
11. BAUTISTA CR, ALVAREZ JA, MOSQUEDA JJ, FALCON A, RAMOS JA, ROJAS C *et al.* Enhancement of the Mexican bovine babesiosis vaccine efficacy by using *Lactobacillus casei*. *Ann NY Acad Sci* 2008;1149:126-130.
12. ÁLVAREZ MJA, CANTÓ AG. Epidemiología de la babesiosis. En: QUIROZ ROMERO, H. Parasitología. México DF, Vol. Conmemorativo de la Sociedad Mexicana de Parasitología SC, 1985:55-72.

13. BAUTISTA-GARFIAS CR, IXTA O, ORDUÑA M, MARTINEZ F, AGUILAR B, CORTES A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: Effect on *Trichinella spiralis* infection. Vet Parasitol 1999;80:251-260.
14. BAUTISTA-GARFIAS C, IXTA-RODRIGUEZ O, MARTINEZ-GOMEZ F, LOPEZ M, AGUILAR-FIGUEROA B. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. Parasite 2001;8:226-228.
15. GUGLIELMONE AA, LUGARESI CI, VOLPOGNI MM, ANZIANA OS, VANZINI VR. Babesial antibody dynamics after cattle immunization with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescence test. Vet Parasitol 1997;70:33-39.
16. OLIVAREZ SAENZ E. Paquete de diseños experimentales, Marín (NL) México: Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 1994.
17. MALDONADO GALDEANO C, PERDIGON G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. ClinVacc Immunol 2006;13:219-226.
18. VIZOSO PINTO MG, RODRIGUEZ GOMEZ M, SEIFERT S, WATSI S, HOLZAPFEL WH, FRANZ CMAP. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells *in vitro*. Int J food Microbiol 2009;133:86-93.
19. BAUTISTA GARFIAS CR, MOSQUEDA GUALITO JJ. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. Vet Mex 2005;36:453-468.
20. FERWERDA G, NETEA MG, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JWM, ROMANI L, KULLBERG BJ. The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. Vaccine 2010;28:614-22.
21. NAIMAN BM, ALT D, BOLIN CA, ZUERNER R, BALDWIN C. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. Infect Immun 2001;69:7550-7558.
22. NAIMAN BM, BLUMERMAN S, ALT D, BOLIN CA, BROWN R *et al*. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells. Infect Immun 2002;70:6147-6157.
23. SHKAP V, LEIVOVITZ B, KRIGEL Y, HAMMERSCHLAG J, MARCOVICS A, FISH L *et al*. Vaccination of older *Bos taurus* bulls against bovine babesiosis. Vet Parasitol 2005;129:235-242.
24. GOFF WL, JOHNSON WC, HORN RH, BARRINGTON GM, KNOWLES DP. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. Parasite Immunol 2003;25:185-188.
25. HOMER MJ, AGUILAR-DELFIN I, TELFORD III SR, KRAUSE PJ, PERSING DH. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000;13:451-469.
26. AGUILAR-DELFIN I, WETTSTEIN PJ, PERSING DH. Resistance to acute babesiosis is associated with interleukin-12- and gamma interferon-mediated responses and requires macrophages and natural killer cells. Infect Immunol 2003;71:2002-2008.
27. INOKUMAH, KERLIN RL, KEMPDH, WILLADSEN P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. Vet Parasitol 1993;47:107-118.
28. JONSSON NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Vet Parasitol 2006;137:1-10.
29. BACHMANN MF, JENNINGS CT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. Nat Rev Immunol 2010;10:787-796.