

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Babesia bigemina* (SMITH; KILBORNE, 1893) (PROTOZOA: BABESIIDAE) EM *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)

JAIRO D. BARREIRA<sup>1</sup>; MARIA INÊS D. ROSSI<sup>2</sup>; GIL VICENTE O. DA SILVA<sup>3</sup>;  
FABIANO A. PIRES<sup>4</sup>; CARLOS L. MASSARD<sup>5</sup>

**ABSTRACT:-** BARREIRA, J.D; DORIA ROSSI, M.I; SILVA, G.V.O; PIRES, F.A; MASSARD, C.L [Morfologic characterization and biological aspects of evolutive forms of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).] Caracterização morfológica e aspectos biológicos das formas evolutivas de *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2005. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil. E-mail: jairobarreira@bol.com.br/

The development of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* were studied in experimental conditions, using crossed-breed bovine from free-area of these parasites. Stages of the hemoparasites were observed in the tick vector, starting from the infected red-blood cells observed in the gut of engorged females, from the first 24 hours after detachment to the emergence of sporokinets in the larvae. In the period from 24 to 48 hours after detachment of the engorged females (DEF), the presence of some infected red-blood cells was verified, beside the occurrence of ray bodies and of vermicular forms, known as oocynets. Since 72 hours after the DEF, the of okinets presence was observed in the cytoplasm of the epithelium cells besides of great sporokinets number in desenvolvimento. At same period, the presence of sporokinets of *B. bigemina* in the hemolymph samples was observed inside the hemocytes. After the fourth day of incubation beside the presence of the sporokinets was also verified in the Malpighi's tubes and ovaries. As well as in the ticks eggs from the sporokinets were also observed ticks eggs from the fourty day after the natural detachment of the engorged females of the host.

**KEY WORDS:** *B. bigemina*, life cycle, *B. microplus*; experimental infection.

## RESUMO

O desenvolvimento de *Babesia bigemina* em *Boophilus microplus* foi estudado em condições experimentais, usando bovinos mestiços originados de região livre destes parasitos. Foram

observados estágios de desenvolvimento dos hemoparasitos no carrapato vetor, a partir da presença de eritrócitos infectados na luz intestinal de fêmeas ingurgitadas do carrapato, desde as primeiras 24 horas após o desprendimento, até o aparecimento de esporocinetos nas larvas. No período de 24 a 48 horas, após a queda das fêmeas ingurgitadas (QFI), verificou-se além da presença de alguns eritrócitos infectados, a ocorrência de corpos raiados e de formas vermiculares, denominados oocinetos. A partir de 72 horas após a queda das fêmeas ingurgitadas, a presença de oocinetos no citoplasma das células epiteliais foi observada além de um grande número de esporocinetos em desenvolvimento. No mesmo período, foi observada a presença de esporocinetos de *B. bigemina* nas amostras de hemolinfa e no interior dos hemócitos. A partir do quarto dia de incubação, verificou-se também a presença dos esporocinetos nos túbulos de Malpighi e ovários. Os esporocinetos foram também observados em amostras de ovos a partir do quarto dia após a queda natural das fêmeas ingurgitadas.

<sup>1</sup>Doutor em Ciências Veterinárias. Rua Venâncio Veloso, 35, Apt° 102, Recreio dos Bandeirantes, Rio de Janeiro, RJ 22790-420. E-mail: jairobarreira@bol.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900. E-mail: midoria@uol.com.br

<sup>3</sup>Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. Bolsista PROCAD/CAPES. E-mail: gilsilva75@yahoo.com.br

<sup>4</sup>CPGCV, IV, UFRRJ, Bolsista CNPq. E-mail: fapvet@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ. E-mail: carlosmassard@ufrj.br.

**PALAVRAS-CHAVE:** *B. bigemina*, ciclo biológico, *B. microplus*; infecção experimental.

## INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos referentes ao desenvolvimento de parasitos do gênero *Babesia* no carrapato vetor foram realizados por Koch (1906), que demonstrou a presença de formas evolutivas de *B. bigemina* em *Rhipicephalus evertsi* e *Hyalomma aegyptium*. Neste trabalho, foram observadas estruturas de aspectos claviformes, piriformes ou mesmo amebóides (RIEK, 1964). Posteriormente, outros trabalhos foram realizados na tentativa de conhecer o comportamento biológico das espécies do gênero *Babesia* nos respectivos vetores (DENNIS, 1932; RIEK, 1964, 1966; FRIEDHOFF; BUSCHER, 1976; STEWART, 1978; DALGLIESH et al., 1981; MEHLHORN; SCHEIN, 1984; STEWART et al., 1986). Os resultados encontrados na literatura sobre aspectos biológicos e morfológicos das estruturas de *B. bigemina* nos diferentes órgãos do carrapato vetor *B. microplus* são divergentes, quando são analisados e confrontados.

O desconhecimento sobre alguns pontos do ciclo biológico destes protozoários motivaram-nos a desenvolver um experimento no qual o objetivo fosse identificar e caracterizar o comportamento evolutivo de *B. bigemina* no vetor *B. microplus*.

## MATERIALE MÉTODOS

### Obtenção e manutenção dos animais

Neste experimento foram utilizados cinco animais (B 339, B 340, B 341, B 342 e B 343) mestiços *Bos taurus* X *B. indicus*, machos com 6 meses de idade, obtidos no Planalto do Itatiaia, região livre do vetor *B. microplus*.

### Obtenção de larvas de *B. microplus* livres de *Babesia* spp.

Foram utilizadas 350 fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* coletadas de bovinos mantidos no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No laboratório as fêmeas ingurgitadas foram colocadas em placas de Petri, identificadas e incubadas em câmara climatizada a temperatura de 27°C e umidade relativa superior a 80% Neitz et al. (1971). Após o período de incubação de cinco dias conforme Mahoney e Mirre (1971) e Akinboade e Dipeolu (1981), amostras de hemolinfa de cada fêmea foram coletadas, coradas pela técnica de Giemsa e examinadas em microscópio óptico com aumento de 1000X. Somente as fêmeas negativas foram utilizadas para produção de ovos. Ovos do início de postura foram coletados, pesados em amostras de 0,2 g e acondicionados em seringas plásticas descartáveis adaptadas para a criação de carrapatos. Dez dias após a eclosão, amostras das larvas foram utilizadas para infestar animais sensíveis (B 339 e 340) onde cada bezerro recebeu aproximadamente 4000 larvas (0,2 g de ovos). Estes animais foram controlados diariamente através de exame clínico e laboratoriais, como: volume globular e esfregaços sanguíneos corados pela técnica de Giemsa. A principal finalidade das infestações foi verificar se as larvas obti-

das estavam negativas, reforçando as provas realizadas com amostras de hemolinfa.

### Obtenção de larvas de *B. microplus* infectadas com *B. bigemina*

As infestações do bezerro com larvas, obtidas segundo Thompson (1976) e Mahoney e Mirre (1971), foram realizadas por um período de 12 dias consecutivos com aproximadamente 4.000 de larvas de *B. microplus* (provenientes de 0,2 g de ovos) livres de *B. bigemina*. Quinze dias após a primeira infestação o bezerro (B 341) foi inoculado (Amostra gentilmente cedida pela Dr.<sup>a</sup> Rosângela Zacarias Machado, Jaboticabal, São Paulo – Brasil.) com 5 ml de sangue positivo para *B. bigemina* por via intravenosa, permitindo assim, que a parasitemia causada pelo sangue inoculada viesse a coincidir com o desenvolvimento e queda natural das fêmeas ingurgitadas.

As fêmeas ingurgitadas que se desprenderam naturalmente, foram coletadas e receberam o mesmo tratamento adotado para as fêmeas ingurgitadas não-infectadas. Posteriormente a seleção, as fêmeas ingurgitadas comprovadamente infectadas pela presença de esporocinetos em esfregaços de hemolinfa, foram mantidas em placas de Petri (100 x 200 mm) fixadas com fitas adesivas para permitir a seleção de ovos originados das fêmeas ingurgitadas infectadas.

Os ovos obtidos no período de seis à doze dias após o início da postura, levando-se em consideração o período de migração para o ovário das fêmeas ingurgitadas comprovadamente infectadas, pela presença de esporocinetos em esfregaços de hemolinfa (BARREIRA, 1988). Foram pesados em amostras de 0,5 g de ovos e acondicionadas sob as mesmas condições das utilizadas para as amostras não infectadas.

### Infecção experimental dos carrapatos

O bezerro não esplenectomizado (B 342) foi infestado durante doze dias alternados com 4.000 larvas não infectadas de *B. microplus*. Após o décimo dia, foi realizada uma segunda infestação com 10.000 larvas infectadas de *B. microplus* infectadas com *B. bigemina*. No laboratório, as fêmeas ingurgitadas que se desprenderam naturalmente foram lavadas com água corrente, secas em papel de filtro e acondicionadas em tubos de vidro. Os tubos foram fechados com algodão hidrófilo, identificados e acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de 28 °C e umidade relativa superior a 80%. As fêmeas ingurgitadas permaneceram incubadas por um período de 30 dias.

### Avaliação da infecção das fêmeas de *B. microplus*

Para estudar o desenvolvimento dos esporocinetos de *B. bigemina* nos diferentes órgãos do carrapato *B. microplus* e o grau de infecção de fêmeas ingurgitadas, foram examinados esfregaços de hemolinfa de 100 fêmeas que se desprenderam naturalmente do hospedeiro vertebrado (B 343). As fêmeas utilizadas foram colhidas no período em que foi observada,

através dos esfregaços sangüíneos, uma parasitemia de 1,3% para *B. bigemina*.

#### A – Exame de hemolinfa

Os esfregaços de hemolinfa foram preparados a partir da secção do tarso ou tibia com o auxílio de tesoura cirúrgica, por um período de 17 dias consecutivos. As amostras coletadas foram depositadas em lâminas de vidro para microscopia e secas em temperatura ambiente, fixadas em metanol por três minutos e coradas pelo corante de Giemsa por 30 minutos, segundo Burgdorfer (1970) e Barreira (1988).

#### B – Exame dos Órgãos Internos

As amostras dos órgãos internos foram coletadas das fêmeas ingurgitadas comprovadamente infectadas durante um período de 216 horas. Nas primeiras 24 horas, as amostras foram coletadas com intervalos de 6 horas, passando em seguida para 24 horas.

Os órgãos foram coletados separadamente, lavados em solução salina e depositados em lamina de vidro para microscopia. Os esfregaços previamente secos, foram fixados e corados de acordo com metodologia aplicada às amostras de hemolinfa.

#### C – Exame de ovos e larvas

As amostras de ovos foram obtidas das fêmeas que ingurgitaram e desprenderam-se naturalmente do hospedeiro. Ovos de final de postura obtidos de fêmeas comprovadamente infectadas foram selecionados e incubados à temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%. As amostras foram coletadas durante o período de incubação dos ovos, com intervalos de 24 horas.

Posteriormente às eclosões, 10 amostras contendo 10 larvas não alimentadas, foram coletadas por um período de 10 dias consecutivos. Da mesma forma, 10 amostras de larvas alimentadas foram coletadas do bovino (n. 342) com intervalos de 24 horas durante quatro dias consecutivos. As amostras de ovos e larvas foram preparadas a partir de macerados e tratadas de acordo com a técnica utilizada para órgãos internos (BARREIRA, 1988).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Hospedeiro vertebrado

Após 12 dias de incubação, período em que a parasitemia calculada era de 1,3%, observaram-se formas intraeritrocíticas com aspectos piriformes simples ou pareadas, arredondadas, amebóides e raramente bizarras (Fig. 1a), conforme encontrados por Riek (1964) e Gardiner et al. (1998). Com o aumento do grau de parasitemia (18%), verificou-se o aumento do número de formas amebóides, alongadas e bizarras, embora com predominância de estruturas piriformes simples ou pareadas.

#### Hospedeiro invertebrado

**Tubo digestivo:** Todas as formas evolutivas de *B. bigemina* descritas nas amostras de sangue do hospedeiro vertebrado

foram também observados nos esfregaços de conteúdo intestinal das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* durante as primeiras horas após desprenderem-se naturalmente do hospedeiro (Fig. 1b). Observações estas concordantes com aquelas mostradas por Riek (1964 e 1966) e Stewart et al. (1986) e Barreira (1988). Nenhuma diferença morfométrica foi observada nas estruturas intraeritrocíticas encontradas nas amostras coletadas dos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Nas primeiras 24 horas, foram observadas no conteúdo intestinal, parasitos com formas arredondadas no interior dos eritrócitos. Estes parasitos apresentaram-se com vacúolo central, envolvido por uma delgada camada de citoplasma corado de azul e um núcleo vermelho escuro localizado na região marginal. Comportamento este relacionado ao processo evolutivo dos parasitos (trofozoítos).

Estruturas de aspecto raiado (Fig. 1c) em amostras de conteúdo intestinal das fêmeas ingurgitadas após o período de 24 a 48 horas de incubação foram observadas. Estas formas apresentaram-se arredondadas com citoplasma corado de azul escuro, um pequeno núcleo central vermelho escuro com flagelos, conferindo o aspecto raiado. Resultados semelhantes foram encontrados por Friedhoff e Buscher (1976); Weber e Friedhoff (1977); Watterndorff (1980); Dalglish et al. (1981) e Mehlhorn e Schein (1984), os quais consideraram as formas raiadas como estágio evolutivo de desenvolvimento relacionado a um processo de reprodução sexuada. Estas mesmas foram consideradas por Mehlhorn e Schein (1984) como anisogametas em avaliações a microscopia eletrônica.

No mesmo período, estruturas arredondadas foram também visualizadas nas amostras de conteúdo intestinal. Nestes parasitos observou-se uma massa nuclear densa, corada de vermelho-escuro, localizado na região mediana e o citoplasma com distribuição uniforme corado de azul claro.

Nas mesmas amostras, foram identificados parasitos com aspecto claviforme, como sendo *B. bigemina*. Constituído de núcleo central, arredondado, corado intensamente de vermelho, localizado na região mediana, embora tenha sido observado deslocamento para região posterior. O citoplasma corado de azul, distribuído uniformemente em toda a sua extensão e uma massa de cromatina vermelha localizada na extremidade anterior (denominada de “Cape”), idêntica ao observado no núcleo. Algumas formas apresentaram pequenos vacúolos distribuídos em toda região citoplasmática. Estas formas foram denominadas oocinetos (Fig. 1d). Estruturas semelhantes foram observadas por Koch (1906), Crawley (1915), Rosenbusch (1927), Dennis, (1932), Petrov (1941) e Riek (1964) ao estudar o comportamento biológico de *B. bigemina* nos respectivos vetores.

No final do período de 48 horas, os oocinetos penetraram na parede intestinal do carrapato e após multiplicação do tipo esporogônico (Fig. 1e), dando origem aos esporocinetos que em seguida migravam para a cavidade geral do vetor *B. microplus*. Observações estas já descritas por Petrov (1941), Muratov e Kheisin (1959), Riek (1964) e Mehlhorn e Schein (1984).



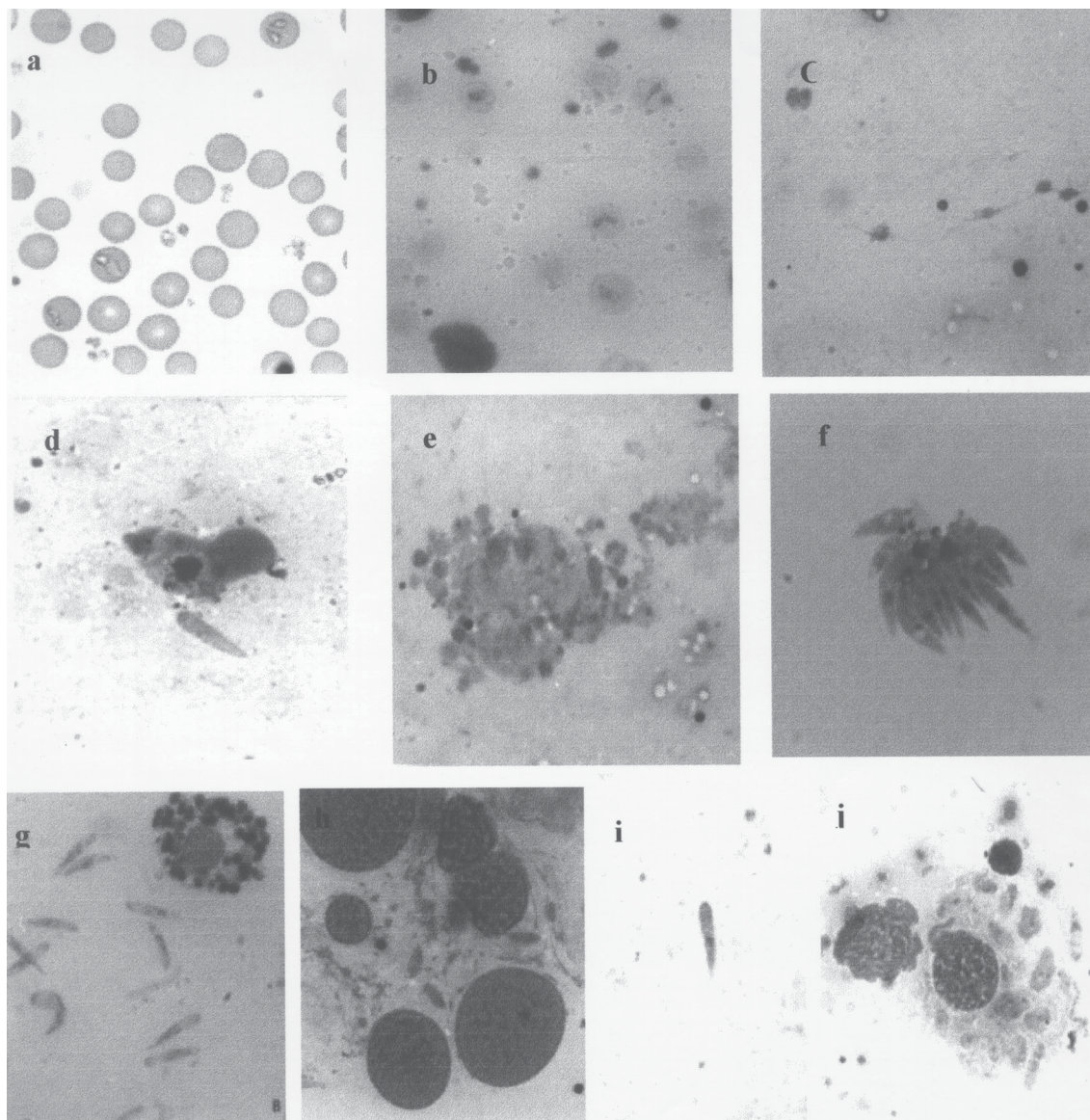


Figura 1. Formas evolutivas de *Babesia bigemina*: trofozoítas (a) em sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Trofozoítas (b), Corpos raiados (c), oocinetos (d) em conteúdo intestinal e formas em multiplicação na célula intestinal (e). Esporocinetos imaturo (f), maduro (g) em hemolinfa e formas de multiplicação (h) observadas no ovário de teleóginas de *Boophilus microplus*. Esporocinetos em ovos (i) e formas em multiplicação (j) em células intestinais de larvas de *B. microplus*. Giemsa, 1000X

**Hemolinfa:** Os primeiros esporocinetos de *B. bigemina* foram observados em amostras de hemolinfa coletadas de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* com 72 horas de incubação (Fig. 1f) dados concordantes com as observações de Riek (1964) e Stewart et al. (1986) para *B. bigemina*.

Os esporocinetos imaturos de *B. bigemina* apresentavam-se com um aspecto vermicular, possuindo um núcleo redondo corado fortemente de vermelho, localizado na extremidade posterior, embora em algumas formas, tenha sido observado na região mediana, com citoplasma denso e bem distribuído, corado de azul claro em toda a sua extensão. O ponto de cromatina corado de vermelho escuro apresentava-se na extremidade anterior. Observações semelhantes foram realiza-

dos por Riek (1964) e Morzaria e Broklesby (1977) ao caracterizar as formas imaturas de *B. bigemina* em fêmeas de *B. microplus*. No entanto, os esporocinetos podem aparecer na hemolinfa somente a partir do quinto dia de incubação (AKINBOADE; DIPEOLU, 1981).

Os esporocinetos maduros de *B. bigemina* apresentavam-se com o núcleo localizado na região mediana e o citoplasma corado de azul-claro com pequenos vacúolos distribuídos em toda sua extensão. Observou-se ainda que com o aumento do período de incubação das fêmeas ingurgitadas, os esporocinetos apresentaram um maior número de vacúolos, correspondendo às observações realizadas por Riek (1964, 1966), Morzaria e Brocklesby (1977) e El Allaway (1977).

Formas imaturas e maduras dos esporocinetos de *B. bigemina* (Fig. 1g) foram observadas nas amostras de hemolinfa por um período de 17 dias. Durante este período, foi registrado um acentuado número de formas imaturas, principalmente a partir de 96 horas de incubação. As maiores e as menores medidas obtidas nas mensurações dos comprimentos durante o período de 10 dias de incubação apresentaram valores paramétricos de 12,95 - 16,05mm e 9,1 - 11,35mm respectivamente. Os valores médios observados variam de 11,53 a 12,67mm. Nas mensurações das larguras, os valores paramétricos das maiores medidas variam de 3,0 - 6,9 mm e das menores medidas de 1,65 - 1,90mm com dados médios variando de 2,48 a 2,89mm. Estes valores foram utilizados para a caracterização da espécie *B. bigemina*.

Nestas mensurações, observou-se que os valores paramétricos foram semelhantes aos dados obtidos por Riek (1964) e Morzaria e Brocklesby (1977).

**Ovário:** Nos exames realizados, apenas as amostras de ovário coletadas de fêmeas ingurgitadas a partir de 96 horas de incubação apresentaram-se infectados por *B. bigemina* e *B. bovis*, estando de acordo com as observações de Riek (1964, 1966).

Os parasitos observados nas amostras com quatro e cinco dias de incubação eram vermiculares com núcleo redondo ou ligeiramente oval, corados intensamente de vermelho, geralmente localizados na região mediana (Fig. 1h). O citoplasma corado de azul claro com a distribuição normal em todo o parasito, entretanto em algum esporocinetos tenha sido constatada a presença de vacúolos que podem variar em número e tamanho. Uma massa de cromatina foi observada freqüentemente na extremidade anterior. Estas formas também foram observadas por Koch (1906); Regendanz (1936); Muratov e Kheisin (1959) e Riek (1964, 1966).

Os esporocinetos encontrados nas amostras de ovário coletados entre o sétimo e nono dia de incubação apresentaram-se com aspecto vermicular, com a extremidade anterior ligeiramente dilatada, o citoplasma corado de azul claro contendo vários vacúolos, e um núcleo na região mediana corado de vermelho. A ponta de cromatina raramente foi observada, no entanto, quando presente apresentaram-se menor que a descrita nas formas de início de incubação das fêmeas. Os vacúolos observados nos esporozoítos tornaram-se mais acentuados com o aumento do período de incubação das fêmeas ingurgitadas.

Neste período também foram registradas as presenças de parasitos de formas ovais ou arredondadas, com um ou dois pontos de cromatina corados fortemente de vermelho e o citoplasma denso e bem distribuído corado de azul escuro.

Nas mensurações realizadas, os esporozoítos de *B. bigemina* apresentaram-se entre 10,55 - 13,0mm de comprimento e 2,90 - 3,60mm de largura. As formas arredondadas, 2,05 - 4,35mm de diâmetro.

**Túbulos de Malpighi:** Um pequeno número de esporocinetos foi encontrado a partir do quarto dia de incubação, porém com mais freqüência a partir do quinto dia, o que

está de acordo com as observações de Riek (1964). Estes parasitos apresentam-se morfológicamente idênticos aos observados nas amostras de ovário coletados com cinco dias de incubação.

As formas utilizadas para os estudos morfológicos apresentaram valores de 9,6 - 13,8mm de comprimento e 3,55 - 3,65mm de largura.

**Ovos:** O aparecimento inicial dos esporocinetos (Fig. 1i) ocorreu nas amostras de ovos coletados de fêmeas ingurgitadas infectadas com *B. bigemina* com quatro a cinco dias de incubação. Neste período, os esporocinetos apresentaram-se com aspectos semelhantes às encontradas nas amostras de hemolinfa, túbulos de Malpighi e ovário.

Os esporocinetos observados nas amostras coletadas no final do período de incubação, apresentaram algumas variações morfológicas quando comparados com os descritos inicialmente. O núcleo central apresentou-se menos compacto e vermelho claro, o citoplasma corado de azul claro evidenciou grandes vacúolos. O ponto de cromatina situado na extremidade anterior raramente foi observado. Os esporocinetos encontrados nas amostras de início e final de incubação mediram de 12,25 - 13,75mm de comprimento por 30 - 32mm de largura, e 20,45 - 24,50mm de comprimento por 3,55 - 3,70mm de largura, respectivamente.

**Larvas:** Nas amostras coletadas, verificou-se (Fig. 1j) presença de formas vermiculares no interior do citoplasma das células intestinais. Estas formas apresentaram um núcleo central corado de vermelho escuro e o citoplasma bem distribuído corado de azul claro, e o ponto de cromatina corado intensamente de vermelho localizado na extremidade anterior, embora em alguns esporocinetos esta estrutura não foi observada. Células intestinais infectadas com estruturas vermiculares, arredondadas e ovais foram também observadas nestas amostras. As formas arredondadas e ovais apresentaram um grande núcleo central corado de vermelho escuro e o citoplasma de azul claro, distribuído uniformemente. Estas formas parecem estar relacionadas com o processo evolutivo do parasito nas células intestinais do vetor. As estruturas vermiculares apresentaram as mesmas características morfológicas descritas para os esporocinetos encontrados nas amostras de hemolinfa, Túbulo de Malpighi, ovário e ovos no início de incubação dos mesmos.

As medidas encontradas para as formas vermiculares intracelulares variaram de 14,15 - 21,75mm de comprimento e 3,1 - 3,7mm de largura; para as arredondadas foram de 11,0 - 13,2mm de diâmetro e para as ovais 14,35 - 16,30mm de comprimento e 4,30 - 4,75mm de largura.

As diferentes fases de desenvolvimento de *B. bigemina* observadas em paredes de tubo digestivo, hemolinfa, túbulos de Malpighi, ovário, ovos e células intestinais de larvas não alimentadas são precedidas de estruturas vermiculares. Apesar do ciclo biológico ocorrer nos diferentes órgãos do carrapato vetor, todas as estruturas vermiculares apresentaram as mesmas características morfológicas.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINBOADE, O.A.; DIPEOLU, O.O. Detection of *Babesia bovis* infections in *Boophilus geigyi* with egg crushings larval smears, and haemolymph puncture. *Veterinary Quarterly*, v. 3, n. 3, 143-147, 1981.
- BARREIRA, J.D. *Caracterização Morfológica, Aspectos Biológicos e Patogenia das formas evolutivas de Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babes, 1888) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 1988. 103 p. (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1988.
- BURGDORFER, W. A technique for detection of rickettsiae in tick. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 19, n. 6, p. 1010-14, 1970.
- CRAWLEY, H. Note on the Stage of *Piroplasma bigeminum* which occurs in the cattle tick, *Margaropus annulatus*. *Journal Parasitology*, v. 2, n. 1, p. 87-92, 1915.
- DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P.; DUNCALFE, F. Reduction in pathogenicity of *Babesia bovis* for its tick vector *Boophilus microplus* after rapid blood passage in splenectomized calves. *Zeitschrift für parasitenkunde*, v. 64, n. 3, p. 347-351, 1981.
- DENNIS, E.W. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne) of Texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus* (Say). *University California Publication in Zoology* v. 36, n. 11, p. 263-298, 1932.
- EL ALLAWY, T.A. Detection of *Piroplasma* in the tick vector haemolymph and eggs smears of tick with special reference to the effect of incubation time on the infectivity of tick eggs. *Agricultural Research Review* v.55, n.1, p. 9-13, 1977.
- FRIEDHOFF, K.T.; SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* of ticks. In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. Babesiosis. New York, Academic Press., 1981. p. 267-327.
- FRIEDHOFF, K.T.; BUSCHER, G. Rediscovery of Koch's strahlenkörper of *Babesia bigemina*. *Zeitschrift für parasitenkunde*. v. 50, n. 3, p. 345-347, 1976.
- GARDINER, C.H.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1998. p. 71.
- KOCH, R. Beitrag zur entwick lungsgeschichte der piroplasmen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektion*, v. 54, n. 1, p. 1-9, 1906.
- MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: information of infection rate in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Annal of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 65, n. 3, p. 309 - 317, 1971.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: Cycle and sexual stage. *Advances of Parasitology*, v. 23, n. 1, p. 37-103, 1984.
- MORZARIA, S.P.; BROCKLESBY, D.Y. A differential diagnostic criterion for *Babesia major* and *Babesia bigemina*, vermiculus from tick haemolymph. *Zeitschrift für parasitenkunde*, v. 52, n. 3, p. 241-243, 1977.
- MURATOV, E.A.; KHEISIM, E.M. The development of *Piroplasma bigeminum* in the tick *Boophilus microplus*. *Zoologicheskii Zhurnal*, v. 38, n. 6, p. 970-986, 1959.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigation on the life cycle on the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 38, n. 2, p. 215-224, 1971.
- REGENDANZ, P. Über den entwick lungsgang von *Babesia bigemina* in der zecke *Boophilus microplus*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, v. 137, n. 3, p. 423-428, 1936.
- RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia argentina* Lignières, 1903. (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 17, n. 2, p. 247-254, 1966.
- RIEK, R.F. The Cycle of *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) in the tick vector. *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 15, n. 5, p. 802-821, 1964.
- ROSENBUSCH, F. Estudios sobre la tristeza; evolution del *Piroplasma bigemina* en la garrapata (*Boophilus microplus* Can.). *Revista de la Universidad Buenos Aires*, v. 5, n. 6, p. 862-867, 1927.
- STEWART, N.P. Differences in the life cycle between a vaccine strain and an unmodified strain of *Babesia bovis* Babes, 1888) in the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Journal of Protozoology*, v. 25, n. 4, p. 497-501, 1978.
- STEWART, N.P.; DALGLIESH, R.J.; DE VOS, A.J. Effect of different methods of maintenance on the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut *Boophilus microplus*. *Research in Veterinary Science*, v. 40, n. 1 p. 94-98, 1986.
- THOMPSON, K.C. A technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology*, v. 2, n. 2, p. 223-229, 1976.
- WATTERNDORFF, S. *Initial developmental stage of Babesia bigemina in the gut of female ticks (Boophilus microplus)*. *Inaugural Dissertation*. Institut Parasitologie, Tierarzt. Hochschule. Hannover. 1980. 99p.
- WEBER, G.; FRIEDHOFF, K.T. Preliminary observations on the ultrastructure of supposed sexual stage of *Babesia bigemina* (Piraplasmea). *Zeitschrift für parasitenkunde*, v. 5, n. 1, p. 83-92, 1977.

Recebido em 27 de julho de 2004.

Aceito para publicação em 24 de janeiro de 2005.