

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ASPECTOS BIOLÓGICOS E PATOGENIA
DAS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Babesia bovis* (BABÉS, 1888) E
Babesia bigemina (SMITH & KILBORNE, 1893) (PROTOZOA:
BABESIIDAE) EM *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)

JAIRO DIAS BARREIRA

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO
MARÇO, 1988

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ASPECTOS BIOLÓGICOS E PATOGENIA
DAS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Babesia bovis* (BABÉS, 1888) E
Babesia bigemina (SMITH & KILBORNE, 1893) (PROTOZOA:
BABESIIDAE) EM *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)

JAIRO DIAS BARREIRA

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR: DR. CARLOS LUIZ MASSARD

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciências em Medi-
cina Veterinária. Área de Con-
centração em Parasitologia Ve-
terinária.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO
MARÇO, 1988

TÍTULO DA TESE

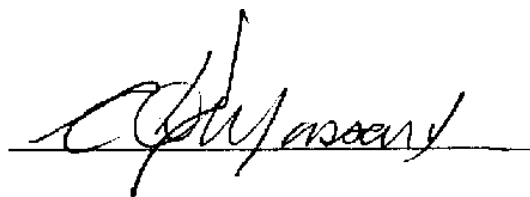
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ASPECTOS BIOLÓGICOS E PATOGENIA
DAS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Babesia bovis* (BABES, 1888) E
Babesia bigemina (SMITH & KILBORNE, 1893) (PROTOZOA:
BABESIIDAE) EM *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)

AUTOR

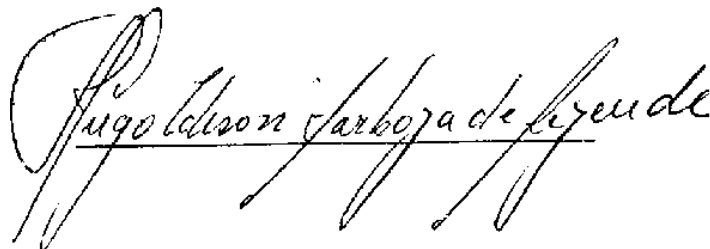
JAIRO DIAS BARREIRA

TESE APROVADA EM: 15/03/1988

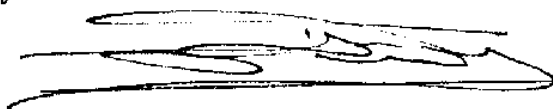
CARLOS LUIZ MASSARD



HUGO EDISON BARBOZA DE RESENDE



NICOLAU MAUÉS DA SERRA FREIRE



*A memória de meu pai ALFRE-
DO, a minha mãe ELZA e a Ma-
RIA INÊS DORIA ROSSI, pelo e-
xemplo de vida.*

*"O homem é uma corda, atada entre
o animal e o além-do-homem, uma
corda sobre o abismo".*

(NIETZSCHE)

AGRADECIMENTOS

Aos professores CARLOS LUIZ MASSARD e CLAUDETE DE ARAÚJO MASSARD pela orientação, amizade e dedicação na minha formação científica e realização deste trabalho.

A Dra. CLAUDETE DE ARAÚJO MASSARD, pela dedicação na realização dos trabalhos fotográficos.

Ao professor NICOLAU MAUÉS DA SERRA FREIRE, pela orientação, ensinamentos científicos e dedicação na estruturação da Tese e elaboração dos estudos estatísticos deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial a DALTON GARCIA DE MATTOS JUNIOR, MÁRCIA DE SENNA NUNES, PAULO CESAR DE FIGUEIREDO, SÉRGIO CARMONA DE SÃO CLEMENTE e VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT, pela amizade, sugestões e apoio durante todo o curso.

Ao Médico Veterinário PAULO ROBERTO DA CONCEIÇÃO, pelo auxílio, amizade e compreensão dedicada durante a realização deste Curso de Pós-Graduação.

A MARIA INÊS DÓRIA ROSSI, pelo estímulo constante durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor GERALDO HELENO DA SILVEIRA, pela realização das cirurgias dos animais utilizados no experimento.

A JEFERSON DIAS BARREIRA e JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA LEMOS, co-responsáveis pela minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-UAPNPSA na pessoa da Dra. CLAUDETE DE ARAÚJO MASSARD.

A todos os funcionários da Área de Parasitologia e da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da UFRRJ, que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, minha sincera gratidão.

BIOGRAFIA

JAIRO DIAS BARREIRA, filho de Alfredo Dias Barreira e Elza da Cunha Barreira, nasceu a 29 de dezembro de 1955, na cidade de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro.

Realizou o curso primário no grupo Escolar Alzira Vargas do Amaral Peixoto, o ginásial no Colégio Municipal Roberto Silveira e o Técnico em Agropecuária no Colégio Agrícola Nilo Peçanha.

No segundo semestre de 1977, ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Fluminense, concluindo-o em 10 de julho de 1982.

Foi monitor da disciplina de Parasitologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense no período de 1981 a 1982.

No período de agosto de 1982 a março de 1984, desenvolveu a atividade de Clínica Médica de pequenos animais na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, sob a direção do médico veterinário Paulo Roberto da Conceição.

Em março de 1984, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Paralelamente ao curso de pós-graduação, vem participando do projeto "Resposta imunológica dos bovinos contra a saliva de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)", em andamento conjunto entre a UFF e UFRRJ, financiado pela FINEP.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Biologia de <i>Babesia bovis</i> e <i>B. bigemina</i> no vetor	4
2.2. Efeitos da infecção por <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>Babesia</i> sp. sobre os carrapatos vetores	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Local do experimento	22
3.2. Obtenção dos animais	22
3.3. Manutenção dos animais em experimento	24
3.4. Obtenção e manutenção de larvas de <i>B. microplus</i> livres de <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	27
3.5. Obtenção e manutenção de larvas de <i>B. microplus</i> infectadas com <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	29
3.6. Infecção experimental dos carrapatos	30
3.7. Métodos e avaliação de infecção das teleóginas	32
3.7.1. Exame da hemolinfa	32

PÁGINA

3.7.2.	Cálculo do grau de infecção das teleó- ginas	33
3.7.3.	Exame dos órgãos internos	34
3.7.4.	Exame de ovos e larvas	35
3.7.5.	Estudos morfométricos das formas evo- lutivas de <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	36
3.8.	Cálculo da parasitemia	37
3.9.	Efeitos da infecção de <i>Babesia</i> sp. sobre te- leóginas de <i>B. microplus</i>	38
4.	RESULTADO E DISCUSSÃO	41
4.1.	Hospedeiro vertebrado	41
4.1.1.	Sangue periférico	41
4.2.	Hospedeiro invertebrado	44
4.2.1.	Tubo digestivo	44
4.2.2.	Hemolinfa	56
	4.2.2.a. Morfologia	56
	4.2,2.b. Infecção das teleóginas	67
4.2.3.	Ovário	73
4.2.4.	Tubos de malpighi	76
4.2.5.	Ovos	78
4.2.6.	Larva não alimentada	83
4.3.	Efeitos da infecção por <i>B. bigemina</i> e <i>B. bo-</i> <i>vis</i> no vetor <i>B. microplus</i>	87
4.4.	Taxa de infecção das teleóginas	90

	PÁGINA
5. CONCLUSÕES	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Merozoítas de <i>Babesia bigemina</i> em eritrócitos de bovino com infecção experimental. Esfregaço de sangue periférico corado pelo método de Giemsa	42
2.	Merozoítas de <i>Babesia bovis</i> em eritrócitos de bovino com infecção experimental. Esfregaço de sangue periférico corado pelo método de Giemsa	43
3.	Merozoítas de <i>Babesia bigemina</i> em eritrócitos de bovinos em conteúdo intestinal de teleógina de <i>Boophilus microplus</i> seis horas pós-queda. Coloração pelo método de Giemsa	46
4.	Formas de <i>Babesia</i> spp. em desenvolvimento no conteúdo intestinal de teleógina de <i>B. micro-</i>	

FIGURA

PÁGINA

- plus* com 24 a 48 horas de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 48
5. Oocineto de *Babesia* spp. em conteúdo intestinal de teleógina de *B. microplus* com três dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 50
6. Células raiadas de *Babesia* spp. em conteúdo intestinal de teleógina de *B. microplus* com 24 horas de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 52
7. Formas em multiplicação de *Babesia* spp. na parede intestinal de teleógina de *B. microplus* com 72 horas de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 55
8. Diferentes estágios evolutivos de esporozoítas de *Babesia* spp. em hemolinfa de teleógina de *Boophilus microplus* com quatro dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 57
9. Esporozoítas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em hemolinfa de teleógina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 59

FIGURA

PÁGINA

10. Esporozoítas de *Babesia bigemina*. Formas maduras e imaturas em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 61
11. Esporozoítas de *Babesia bigemina* em hemócito de teleóquina de *Boophilus microplus* com quatro dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 62
12. Variação do comprimento de esporozoítas de *Babesia bigemina* entre 4 e 13 dias pós-queda das teleóquinas de *Boophilus microplus* indicando-se os valores paramétricos e média 63
13. Variação da largura dos esporozoítas de *Babesia bigemina* entre 4 e 13 dias pós-queda das teleóquinas de *Boophilus microplus* indicando-se os valores paramétricos e média 64
14. Relação entre comprimento e largura de esporozoítas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* indicando-se os valores paramétricos e as médias obtidas sobre 100 esporozoítas de cada espécie 66
15. Número e frequência acumulada de 100 teleóquinas de *Boophilus microplus* com infecção compro-

FIGURA**PÁGINA**

- vada por *Babesia bigemina* no período de 0 a 17 dias pós-queda, alimentadas em bovino experimentalmente infectado 68
16. Percentual sobre 100 teleóginas de *Boophilus microplus* alimentadas em bovino experimentalmente infectado com *Babesia* spp., indicando-se os graus de infecção obtidos no período de 0 a 17 dias pós-queda das teleóginas 69
17. Esporozoitas de *Babesia* spp. com diferentes estágios evolutivos em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com quatro dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 70
18. Esporozoitas de *Babesia bigemina* e *B. bovis* em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 72
19. Esporozoitas de *Babesia* spp. em ovário de teleóquina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa 75
20. Esporozoitas de *Babesia* spp. em túbulos de malpighi de teleóquina de *Boophilus microplus* com cinco dias de incubação. Coloração pelo método

FIGURA**PÁGINA**

de Giemsa	77
21. Número e frequência acumulada de postura de 100 teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com infecção comprovada por <i>Babesia</i> spp. no período de 0 a 17 dias pós-queda, alimentadas em bovino experimentalmente infectado	79
22. Esporozoítas de <i>Babesia</i> spp. em ovos de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com dois dias de incubação. Macerado de ovos corado pelo método de Giemsa	81
23. Esporozoítas de <i>Babesia</i> spp. em ovos de teleógina de <i>Boophilus microplus</i> com oito dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa	82
24. Desenvolvimento de <i>Babesia</i> spp. em citoplasma de células epiteliais do intestino de larvas de <i>Boophilus microplus</i> com dois dias pós-eclosão. Coloração pelo método de Giemsa	85
25. Desenvolvimento de <i>Babesia</i> spp. em citoplasma de células epiteliais do intestino de larvas de <i>Boophilus microplus</i> com três dias pós-eclosão. Coloração pelo método de Giemsa	86

FIGURA**PÁGINA**

26. Número de teleóginas de *Boophilus microplus*, infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de peso entre 240 e 480 mg 88
27. Número de teleóginas de *Boophilus microplus*, não infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de peso entre 180 e 380 mg 89
28. Número de posturas de *Boophilus microplus* infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de pesos de posturas entre 5,36 e 21,45 mg com indicação da média 91
29. Número de posturas de *Boophilus microplus* não infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de pesos de posturas entre 8,01 e 20,00 mg com indicação da média 92

RESUMO

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

Observou-se uma sequência evolutiva dos hemoparasitos no carrapato vetor, partindo da presença de eritrócitos infectados na luz intestinal de teleóginas, durante as primeiras 24 horas após o desprendimento, até o aparecimento de esporozoítas nas larvas. No período de 24 a 48 horas após a queda de fêmeas ingurgitadas, verificou-se além da presença de alguns eritrócitos infectados, a ocorrência de corpos raiados "Strahlenkorper" e de formas vermiformes e que por seus aspectos morfológicos poderiam ser chamadas de oocinetos, podendo portanto estarem relacionados com a ocorrência de gametogonia. Por volta de 72 horas após a queda das teleóginas, foi observado a presença de oocinetos no citoplasma das células epiteliais além de um grande número de esporozoítas imaturos. No mesmo período

foi observado a presença de esporozoítas imaturos e maturos de *B. bigemina* e *B. bovis* nas amostras de hemolinfa, e no interior dos hemócitos. A partir do quarto dia de incubação verificou-se também, a presença dos esporozoítas em amostras de tubos de malpighi e ovário. Estes protozoários foram observados em amostras de ovos a partir do quarto e quinto dia após a queda natural das teleóginas, e em larvas com dois dias pós-eclosão.

Concluiu-se que o período ideal para o diagnóstico das infecções por *B. bigemina* e *B. bovis* em amostras de hemolinfa e ovos corresponde ao oitavo e 13° dia após a queda natural do hospedeiro vertebrado.

Comprovou-se a interferência da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* em relação ao peso e postura das teleóginas após desprenderem-se naturalmente do hospedeiro.

Do total de 100 teleóginas coletadas de bovinos com parasitemia de 1,5% para *B. bigemina* e 0,4% para *B. bovis*, 96% apresentaram-se infectadas. Para o segundo grupo de teleóginas ingurgitadas em bovinos com parasitemia de 1,8% para *B. bigemina* e 0,7% para *B. bovis*, a taxa de infecção observada foi de 88%.

A taxa de mortalidade observada no primeiro e segundo grupo de teleóginas, durante o sétimo e o 12° dia, de incubação foi de 94,79 e 75,0%, respectivamente.

SUMMARY

The development of *Boophilus microplus*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* was studied in experimental conditions in cattle raised in tick free area. The evolution of these blood parasites was followed in the tick vector, starting by the presence of infected erythrocytes in the intestinal lumen of engorged females, 24 hours after the ticks had dropped from the cattle host up to the detection of sporozoites in hatched larvae. During the period of 24 to 48 hours after engorged ticks dropped from the host it was observed the presence of infected erythrocytes as well as the presence of rayed bodies "Strahlenkorper" and vermiform bodies which looklike ookinete, result of gametogony. Ookinete were found in the cytoplasm of epithelial cells 72 hours after ticks had neopped, as well as large number of immature sporozoites. During the some period of time the presence of immature and mature sporozoites of *B. bigemina* and *B. bovis* were found in hemolymph and in hemocytes. The presence of

sporozoites in samples of malpighi tubes and ovaries were noticed at day 4. Eggs examined in the fourth and fifth day after engorged ticks had dropped were found to be positives for the presence of both species of *Babesia*. The ideal period for the diagnostic of *B. bigemina* and *B. bovis* in the hemolymph and in eggs of ticks was found to be at the 8th and 13th day after females dropped from the host, respectively.

The examination of 100 engorged females of *B. microplus* from cattle which had a parasitemia of 1.5% for *B. bigemina* and 0.4% for *B. bovis* were found an infection rate of 96%. A second sample of females which dropped from cattle with a parasitemia of 1.8% for *B. bigemina* and 0.7% for *B. bovis*, had an infection rate of 88%. The evolution of *B. bigemina* and *B. bovis* in the invertebrate host affect the survival of engorged females. The mortality rate of engorged females observed seven and twelve days after dropping from the host for the first and second groups were 94.79% and 75.0%, respectively.

1. INTRODUÇÃO

Das quatro espécies do gênero *Babesia* Starcovici, 1893 que parasitam bovinos (HOYTE, 1976) apenas *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) são encontradas naturalmente infectando bovinos das várias regiões geográficas do Brasil. A distribuição destas duas espécies tem íntima relação com a distribuição geográfica do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) considerada a espécie responsável pela transmissão destes protozoários no país.

No Brasil, a importância econômica dos parasitos do gênero *Babesia* começou a ser considerada no início do século, quando FAJARDO (1901) descreveu pela primeira vez a presença destes parasitos em amostras sanguíneas obtidas de bezerros e adultos recém importados. Tem sido quase impossível definir em termos exatos, a importância destes parasitos no desenvolvimento da pecuária nacional, contudo, é conhecida a interferência destes protozoários no crescimento do rebanho bovino.

As babesias quando não devidamente controladas interferem no desenvolvimento dos animais, reduzindo o crescimento, produção de carne e leite; podendo determinar aborto e infertilidade temporária de machos e fêmeas, e nos casos mais graves, principalmente em animais recém-importados de regiões indenes quando não adequadamente aclimatados e imunizados determinam a morte dos animais. O alto custo para a indução do estado de imunidade dos bovinos importados de áreas indenes, o tratamento com drogas específicas e o controle adequado dos vetores, constituem aspectos importantes no controle destas parasitoses para o avanço da pecuária bovina.

O primeiro trabalho científico envolvendo carrapatos como vetores de protozoários, segundo a literatura médica, deve-se a SMITH & KILBORNE (1893), quando estes caracterizaram a participação de *Boophilus annulatus* (Say, 1821) na transmissão de *Babesia bigemina* para bovinos no Estado do Texas, EUA. A transmissão natural destes parasitos para hospedeiros vertebrados ocorre quando certos estágios do carrapato vetor se alimentam em bovinos sensíveis e inoculam esporozoítas juntamente com a saliva (FRIEDHOFF & SMITH, 1981). Após a inoculação, os esporozoítas entram na circulação sanguínea, invadem os eritrócitos e multiplicam-se assexuadamente, destruindo a célula hospedeira.

O ciclo dos parasitos no hospedeiro invertebrado foi estudado pela primeira vez no início do século, quando KOCH (1906) evidenciou formas evolutivas de *Babesia bigemina* em vá-

rias espécies de carrapatos identificados como *Boophilus australis* (Fuller, 1899), *Rhipicephalus evertsi* (Neumann, 1897) e *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus, 1758) Neumann, 1911. Posteriormente vários trabalhos foram realizados na tentativa de conhecer o comportamento das espécies de babesia nos respectivos carrapatos vetores. RIEK (1964, 1966) estudou o comportamento de *B. bigemina* e *B. bovis* no carrapato *B. microplus*, caracterizando a invasão e multiplicação destes parasitos em vários tecidos incluindo células epiteliais do intestino, células da hemolinfa, músculos, túbulos de malpighi e ovário. Também foram evidenciados em células epiteliais do intestino e glândula salivar de larvas e ninfas. Paralelamente a este estudo relativo ao ciclo biológico, vários autores também evidenciaram o efeito destas espécies de protozoários no carrapato vetor (DAVEY, 1981; GRAY, 1982).

O objetivo deste trabalho foi identificar, comprovar e avaliar a multiplicação de *B. bovis* e *B. bigemina* em vários órgãos do carrapato vetor *Boophilus microplus*. Nesta oportunidade procurou-se ainda avaliar os efeitos patogênicos destes protozoários para o carrapato vetor.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biologia de *Babesia bovis* e *B. bigemina* no vetor

Os primeiros estudos referentes ao desenvolvimento de parasitos do gênero *Babesia* em especial a *B. bigemina* foram de KOCH (1906), CRAWLEY (1915) e ROSEMBUSCH (1927). Estes autores demonstraram a presença de formas evolutivas de *B. bigemina* no intestino, ovos e hemolinfa de *Boophilus annulatus* (Say, 1821), *R. evertsi*, *H. aegyptium* e *B. microplus*. Nestes trabalhos foram relatados aspectos da morfologia das formas encontradas, as quais apresentavam-se quase sempre em forma de clava, piri-forme ou mesmo com aspecto amebóide. ROSEMBUSCH (1927), referindo à multiplicação destas formas em *B. microplus*, relatou a existência de multiplicação por divisão múltipla em células do tubo digestivo e órgãos vasculares das fêmeas ingurgitadas. O autor também relatou aspectos de migração destas formas alongadas na hemolinfa, com posterior invasão das células do aparelho genital e ovário. Após a invasão das células, foi registra-

da a existência de uma segunda multiplicação destas formas durante a embriogênese do ixodídeo, com passagem para a fase larvar a partir do início da eclosão.

DENNIS (1932), ao revisar a literatura sobre a biologia, anatomia e embriologia de *B. annulatus*, descreveu o ciclo biológico de *B. bigemina* em duas fases distintas. A primeira, constituída de um ciclo assexuado descrito no hospedeiro vertebrado, os bovinos, ocorrendo com multiplicação dos parasitos por fissão binária simples no interior dos eritrócitos. A segunda fase descrito como sexuada, ocorrendo no hospedeiro invertebrado. Após a ingestão de eritrócitos infectados, várias formas do parasito foram encontradas no interior de célula ou livre no conteúdo intestinal. Neste trabalho o autor observou que o início do ciclo ocorreu com a fusão de "isogametas" na luz intestinal, resultando na formação de "oocinetos" com grande motilidade. Os oocinetos atravessavam a parede intestinal penetrando em vários órgãos, incluindo os túbulos de malpighi, músculos e ovário. Após penetrarem no ovário os oocinetos tornavam-se redondos, dando formação a "esporoblastos" com aspectos multinucleados, agora denominado "esporocinetos" os quais migravam através de todos os tecidos dos carrapatos. Alguns "esporocinetos" migravam para a glândula salivar das larvas ou ninfas, onde, após a total fragmentação originavam os pequenos "esporozoítas" infectantes para o hospedeiro vertebrado.

Em condições experimentais, REGENDANZ (1936) estudou o comportamento de *B. bigemina* em teleóginas de *B. microplus*,

e verificando que após várias fissões, este hemoparasito apresenta um estágio com características morfológicas vermiformes e com grande motilidade, essas formas invadiam vários órgãos internos do carrapato, incluindo ovários e ovos.

Utilizando ovos, larvas, ninfas e adultos, infectados natural e experimentalmente com *B. bovis*, PETROV (1941) também observou a existência de formas evolutivas com aspectos claviformes, piriformes, redondos e mesmo alguns elementos com forma vermicular no tubo digestivo de fêmeas ingurgitadas. Nos ovários e ovos desta espécie, o autor evidenciou formas arredondadas com grandes núcleos. Na cavidade do corpo de larvas, de ninfas e de adultos, bem como, nos músculos, intestino e glândulas salivares foi demonstrada a existência de elementos arredondados, ovais com núcleo em divisão, e mesmo de corpos pequenos com morfologia vermicular. Baseado nestas observações, este autor propôs um ciclo de natureza esporogônica para *B. bovis* afirmando ter evidenciado a fusão de "isogametas" com posterior formação de "oocinetos"; estes migravam através da parede intestinal de *Ixodes ricinus* (Linnaeus) Latreille, 1804) atingindo a cavidade geral, ovário e ovos. Referiu também que as formas de "oocinetos" migravam pelos órgãos internos durante a fase embrionária, atingindo a glândula salivar das larvas e posteriormente, das ninfas e adultos. Uma vez alcançando a glândula salivar, os parasitos tornavam-se arredondados, cresciam e davam origem a "esporoblastos", os quais evoluíam para "esporozoitas" infectantes.

MURATOV & KHEISIN (1959), estudando o ciclo biológico de *B. bigemina* em *Boophilus calcaratus* (Birula, 1894) (= *B. annulatus*), concluíram que após a fissão binária ou processo esquizogônico inicial, os parasitos penetravam nas células epiteliais do tubo digestivo. Esses parasitos em forma de clava migravam para a cavidade geral do corpo, onde penetravam nos diferentes órgãos, prosseguindo com novas divisões assexuadas. Quando penetravam em ovos, este estágio evolutivo novamente se multiplicava por divisão binária, a semelhança do ocorrido nas células epiteliais do tubo digestivo. Durante a incubação dos ovos havia significativo aumento do número de formas vermiculares, as quais distribuíam-se pelo corpo das larvas em desenvolvimento.

Posteriormente, RIEK (1964) ao estudar o ciclo biológico de *B. bigemina* em *B. microplus* coletados em bovinos com infecção experimental, observou que todas as formas presentes em esfregaços de sangue periférico eram encontradas no interior dos eritrócitos intactos no conteúdo intestinal, durante as primeiras 24 horas. Em seqüência, evidenciou também que várias formas eritrocíticas ingeridas eram destruídas no intestino do vetor, e que somente as formas ovais e arredondadas sobreviviam. A primeira indicação da invasão dos parasitos em células epiteliais do intestino ocorria 24 horas após a repleção, quando foi evidenciada a presença de estruturas fusiformes com uma massa de cromatina na região central, medindo 10 μm x 2 μm . Durante o período de 48 a 60 horas estes parasitos multiplica-

vam-se por fissão múltipla dando origem a um grande número de corpos em forma de clava ou vermículos na luz intestinal. Os vermículos medindo 9,0 - 13,0 um x 2,0 - 2,9 um (média de 11,0 um x 2,5 um) migravam através da parede intestinal, indo para a hemolinfa, onde atingiam a maturidade e invadiam vários órgãos da cavidade geral. Após o quarto dia, alguns vermículos invadiam células dos túbulos de malpighi e da hemolinfa, onde uma segunda multiplicação por fissão múltipla, formava novos vermículos, iguais aos originados nas células epiteliais do intestino. Descreveu ainda que vermículos invadiam o sistema reprodutor, efetivando transmissão vertical e atingindo o estágio larvas, onde novamente multiplicavam-se a nível de células intestinais. O autor verificou que o final do ciclo evolutivo no vetor, ocorria na glândula salivar do estágio ninfal e as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado apareciam 8 a 10 dias após a fixação das larvas. As formas encontradas nesse ciclo, resultaram também de fissões múltiplas, porém diferiam em relação ao tamanho e forma, visto que mediam 2,2 - 2,7 um x 1,0 - 1,5 um, com forma similar aos corpos piriformes encontrados nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado.

RIEK (1966), ao estudar em condições experimentais o desenvolvimento e a morfologia de *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (= *B. bovis*) nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, considerou o ciclo biológico no vetor *B. microplus* similar ao descrito para *B. bigemina* (RIEK, 1964). Nos esfrega-

ços de sangue periférico do hospedeiro vertebrado foram observados parasitos com formas simples e esféricas, ou pareados com aspecto piriforme. Os corpos pareados mediam 1,5 - 2,3 um x 1,0 - 1,5 um (média de 1,8 um x 1,2 um) e apresentavam-se formando um ângulo obtuso. Segundo o autor, estas formas são diferenciadas das de *B. bigemina* com base na morfologia e relação do material nuclear com o citoplasma. No hospedeiro invertebrado, estas formas foram observadas nos eritrócitos intactos em esfregaços do conteúdo intestinal, quando confeccionados logo após a queda natural das teleóginas. Após o período de 24 horas o número de parasitos degenerados tendiam a reduzir, predominando as formas esféricas. Por volta de 38 horas, parasitos em formas de charutos evoluíam por fissão múltipla. As primeiras formas vermiculares foram encontradas na hemolinfa a partir do terceiro e quarto dia de incubação. Mais tarde, os vermículos maduros medindo 14,3 - 16,9 um x 2,8-3,5 um (média de 15,8 um x 3,0 um) migravam para o ovário, penetravam nos ovos, onde estabeleciam um ciclo nas células intestinais das larvas em desenvolvimento, produzindo vermículos semelhantes aos observados nas teleóginas. Dois a três dias após a fixação das larvas, estas formas migravam para as glândulas salivares, onde multiplicavam-se por fissão múltipla, as quais tornavam-se infectantes para o hospedeiro vertebrado. As formas infectantes adquiriam um aspecto piriforme no interior da glândula salivar, medindo em torno de 1,5 x 1,0 um.

Em seus estudos sobre a taxa de infecção no carrapato vetor *B. microplus* mantidos em bovinos infectados com *B. argentina* e *B. bigemina*, MAHONEY & MIRRE (1971) observaram a presença de vermiculos nas amostras de hemolinfa coletadas de teleóginas entre o quinto e sétimo dia de incubação. Verificaram também, que no total de teleóginas coletadas dos bovinos infectados com *B. argentina*, 30% apresentavam-se infectadas. Entretanto, nas teleóginas obtidas de bovinos infectados com *B. bigemina*, a taxa de infecção foi de 36%.

MUANGYAI (1974), ao realizar estudos quantitativos da infecção transovariana de *B. microplus* com *B. bigemina*, verificou que esta infecção pode ser constatada a partir de 13 ou 16 horas após o início da postura. Porém, concluiu que o terceiro dia de incubação era o período ideal para a realização dos exames dos esfregaços de ovos. Nas amostras coletadas o autor constatou que os merozoítas encontrados nos ovos eram menores do que os observados em amostras de hemolinfa originados da mesma teleógina.

FRIEDHOFF & BUSCHER (1976), após revisarem os trabalhos que apresentavam propostas sobre o estágio sexual de *Theileria parva* (Theiler, 1904), estudaram o desenvolvimento de *B. bigemina* em fêmeas de *B. microplus*. Nos exames das amostras de conteúdo intestinal extraído de teleóginas recolhidas após o desprendimento natural de bovinos experimentalmente infectados, observaram grande número de formas do parasito com aspecto raiado (Strahlenkorper) com acentuada variação na mor-

fologia e tamanho durante o período de sete a 19 horas de incubação. Embora estes dados tenham sugerido uma grande evidência da existência de reprodução sexuada em *B. bigemina*, os autores não conseguiram explicar a importância destas formas no ciclo biológico deste protozoário.

MAHONEY & MIRRE (1977), observando a dinâmica da transmissão transovariana de *B. bovis* por *B. microplus*, revelaram uma baixa proporção de ovos infectados durante os primeiros cinco dias após a queda das teleóginas. Entretanto, as amostras de ovos coletados no sexto e sétimo dia apresentaram índice de infecção acentuado.

Em estudos experimentais, WATTENDORFF (1977) descreveu quatro fases evolutivas do desenvolvimento de *B. bigemina* no tubo digestivo de fêmeas de *B. microplus* despreendidas naturalmente de bovinos infectados. Nas primeiras horas após a queda das teleóginas foram observadas várias formas no interior dos eritrócitos, semelhante as encontradas em sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Após 24 horas foram registrados a presença de formas raiadas. Os "esquizontes" e "cine-tos" só foram evidenciados no período compreendido entre 72 e 124 horas após a queda das fêmeas ingurgitadas.

MORZARIA & BROCKLESBY (1977), utilizando dados morfo-métricos como principal critério para o diagnóstico, diferencial entre vermículos de *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parrot, Lestoquard & Plantureaux, 1926) e *B. bigemina* em esfregaços de hemolinfa obtidos de fêmeas de carrapato *Haemophy-*

salis punctata com infecção experimental, observaram a presença de duas formas de vermículos para cada espécie. Os vermículos com vacúolos citoplasmáticos foram considerados como formas maduras e os vermículos não vacuolados como formas imaturas. As medidas dos vermículos imaturos de *B. major* variaram de 16,75 - 16,69 um x 3,86 - 4,15 um (média de 16,22 um x 4,01 um), que após atingirem a maturidade passaram a medir entre 15,20 - 15,86 um x 2,92 - 3,13 um (média de 15,53 um x 3,0 um). As mensurações realizadas em vermículos maduros de *B. bigemina* resultaram em valores menores, que variaram entre 11,46- 12,12 um x 2,45 - 2,65 um (média de 11,79 um x 2,55 um). Ao comparar os valores médios das formas maduras de *B. major* e *B. bigemina*, os autores concluíram que a diferença observada no comprimento dos vermículos podia ser adotada como mais um critério para o diagnóstico diferencial entre estas espécies do gênero *Babesia* parasitos de bovinos.

EL ALLAWY (1977) examinou esfregaços de hemolinfa e ovos de *B. annulatus* infectados com *B. bigemina* e relatou a presença de merozoíta com aspecto claviforme. Cada merozoíta era constituído de um núcleo corado de vermelho, localizado na região mediana, e citoplasma levemente azulado com um grande vacúolo. Estes merozoítas não só apresentavam as mesmas características morfológicas, como também possuíam aproximadamente o mesmo comprimento. Durante a realização dos exames das amostras de ovos com diferentes dias de incubação, foi registrado um aumento progressivo no número de merozoítas, caracterizando

assim a influência do período de incubação na reprodução dos merozoítas e na infectividade dos ovos. Após estas observações o autor considerou o sexto dia de incubação como um limite ideal para realizar os exames das amostras de ovos.

STEWART (1978) trabalhando com duas cepas de *B. bovis*, uma modificada por passagens sucessivas em hospedeiro vertebrado e outra não modificada, observou grandes variações no ciclo biológico destes protozoários no hospedeiro invertebrado *B. microplus*. Os espécimes originados das duas cepas de *B. bovis* encontrados no conteúdo intestinal durante as primeiras 16 horas após a queda natural das teleóginas, apresentavam-se com grande semelhança morfológica. Após este período, suas estruturas se diferenciavam. No período compreendido entre 16 e 24 horas pós repleção, um grande número de parasitos com formas esféricas sem evidenciar sinais de multiplicação foram encontrados em esfregaços de conteúdo intestinal obtidos de teleóginas infectadas com a cepa não modificada. Entre o terceiro e o quarto dia de incubação observou redução das formas esféricas encontradas no conteúdo intestinal, devido a penetração e multiplicação nas células epiteliais e subsequente aparecimento de formas vermiculares na hemolinfa. Ao contrário, as formas esféricas da cepa modificada permaneceram em grande número durante todo o período de observação. Algumas formas sugerindo um processo de multiplicação foram observadas entre 16 e 144 horas pós-repleção. Somente as teleóginas infectadas com cepa não modificada, apresentaram formas evoluti-

vas em vários órgãos como túbulos de malpighi, músculos e ovários, com subsequente infecção e multiplicação nos ovos e larvas. Os vermículos observados em hemolinfa mediram 14 - 16 um de comprimento, no entanto nas larvas foram descritos medindo entre 13 - 16 um de comprimento.

ACHUTHAN et al. (1980), na tentativa de identificar o modo de transmissão de *B. bigemina* para bovinos, utilizaram larvas, ninfas e adultos de *B. microplus*, *B. annulatus* e *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844). Durante a realização do experimento foram examinadas glândulas salivares de todos os estágios evolutivos destes carrapatos. Nos materiais examinados verificaram a presença de esporozoítas com formas alongadas e esféricas em todos os estágios evolutivos dos carrapatos *B. microplus* e *B. annulatus*.

AKIMBOADE & DIPEOLU (1981) investigando a infecção experimental de *B. bovis* e o seu comportamento no carrapato *Boophilus gaigyi* (Aeschlimann & Morel, 1965), concluíram que o aparecimento inicial dos vermículos na hemolinfa ocorria entre o quarto e sexto dia após o ingurgitamento das teleóginas. Posteriormente foi registrado um aumento progressivo no número de vermículos até o oitavo dia; sendo em seguida, observado uma redução acentuada até o total desaparecimento destas formas a partir do 14º dia após a queda natural das teleóginas. Os exames de ovos destas teleóginas registraram a presença de vermículos a partir do quinto dia, com aumento no número de parasitos até o 24º dia de incubação. A partir deste

período, os vermículos raramente foram detectados.

DALGLIESH et al. (1981) verificaram que as passagens sucessivas das cepas de *B. bigemina* no hospedeiro vertebrado interferiam na morfologia e infectividade destes protozoários no intestino do hospedeiro invertebrado *B. microplus*. Os autores consideraram que as fêmeas desta espécie infectadas com cepas de baixa passagem em hospedeiro vertebrado apresentavam número reduzido de corpos raiados durante as primeiras 48 horas de incubação. Ao contrário, as fêmeas infectadas com cepas de alta passagem evidenciaram grande número de corpos raiados no tubo digestivo, por período superior a 72 horas de incubação. Para DALGLIESH et al. (1981) a presença do grande número de formas raiadas estava associada com a redução da infectividade das cepas para o carrapato.

STEWART et al. (1981), descrevendo aspectos do mecanismo de transmissão dos parasitos do gênero *Babesia*, consideraram o ciclo biológico de *B. bigemina* no hospedeiro vertebrado e invertebrado similar ao descrito para *B. bovis*. Os autores observaram que o desenvolvimento do ciclo no hospedeiro invertebrado tinha início com a ingestão dos eritrócitos infectados, seguido da penetração dos parasitos nas células epiteliais do intestino, com subsequente multiplicação e reprodução dos vermículos ou merozoítas. Na hemolinfa, os vermículos migravam para o oviduto, penetravam nos ovos em desenvolvimento, multiplicavam-se e permaneciam inativos até a eclosão das larvas. Quando da fixação destas larvas no hospedeiro verte-

brado, os vermículos alcançavam as células das glândulas salivares produzindo grande número de pequenos merozoítas, que foram consideradas as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado.

EL-ALLAWY (1983) observou a presença de merozoítas de *B. bigemina* nas amostras de ovos coletados de teleóginas de *B. annulatus* experimentalmente infectadas.

MEHLHORN & SCHEIN (1984), estudando o ciclo biológico das espécies do gênero *Babesia*, descreveram vários aspectos do desenvolvimento destes protozoários nos respectivos vetores. Inicialmente observaram a fusão dos gametas na luz intestinal, com produção de "cinetos" durante as primeiras horas após a queda das teleóginas. Constataram também que os cinetos migravam através da parede intestinal e, na cavidade geral, invadindo e reproduzindo-se assexuadamente em células de vários órgãos do carrapato, principalmente nos hemócitos, fibras musculares, túbulos de malpighi e células do ovário, incluindo oócito. Durante o período de incubação dos ovos, os "cinetos" evoluíam nas células epiteliais do intestino das larvas em desenvolvimento. Após o início da fixação das larvas dos carrapatos no hospedeiro vertebrado, as babesias migravam para as glândulas salivares, aí perdiam sua forma característica de cineto dando origem a uma nova fase, denominada "esporonte", a qual evoluía para esporozoíta, considerada a forma infectante para o hospedeiro vertebrado.

GUGLIELMONE et al. (1985), pesquisaram a presença de

vermiculos de *B. bovis* e *B. bigemina* em hemolinfa de teleóginas de *B. microplus* entre o 4° e o 10° dia após desprenderem-se dos hospedeiros. Os autores verificaram que a probabilidade em detectar a presença de vermiculos em fêmeas de *B. microplus* mantidos em bovinos com baixa parasitemia (até 1,5%), foi maior quando os esfregaços de hemolinfa foram confeccionados no período compreendido entre o 9° e o 10° dia após a queda natural das teleóginas. Para as teleóginas mantidas em bovinos com uma parasitemia de 3,5%, o melhor dia para exame foi o 6° dia pós queda da fêmea ingurgitada.

AGBEDE et al. (1985), ao descrever o desenvolvimento de *B. bovis* no intestino de fêmeas de *B. microplus* infectadas experimentalmente, também verificaram a presença de corpos raia-dos (Strahlenkorper) no interior das células basófilas após o terceiro dia de incubação. Observaram ainda a presença de corpos em divisão que, após um período de 24 horas, evoluíram para "cinetos" no interior das células intestinais.

STEWART et al. (1986), estudando o desenvolvimento e a morfologia de *B. bigemina* nas fêmeas de *B. microplus* infectadas naturalmente, observaram nas primeiras 24 horas pós repleção a presença de parasitos com formas ovais, esféricas, amebóides e piriformes, semelhante as descritas em sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Os parasitos piriformes foram encontrados com formas simples ou pareadas. Neste período de 24 horas pós repleção, um pequeno número de parasitos com formas esféricas, medindo aproximadamente 7 um de diâmetro foram

observados no conteúdo intestinal. Nas amostras coletadas 48 horas pós-repleção das teleóginas, os autores identificaram parasitos localizados intra e extracelularmente com estrutura celular precursora de fissão, assim como, corpos imaturos em diferentes fases de divisão celular. Em 72 horas pós-repleção das teleóginas foram observados em grande número de corpos maduros em divisão e vermículos (merozoítas), tanto nas células epiteliais do intestino do carrapato como, aparentemente, na luz intestinal.

2.2. Efeitos da infecção por *B. bovis*, *B. bigemina* e *Babesia* sp. sobre os carrapatos vetores

RIEK (1964), ao descrever o ciclo de *B. bigemina* em *B. microplus*, observou que 90% das teleóginas coletadas de bovinos com parasitemia superior a 20% morreram após o sétimo dia de incubação. Para explicar o fenômeno o autor relacionou esta mortalidade com as alterações da permeabilidade na parede intestinal, em consequência da multiplicação destes protozoários nas células epiteliais e a passagem de hemoglobina para hemolinfa.

Em 1966, KIEK registrou que durante o quinto e o sétimo dia de incubação havia uma acentuada taxa de mortalidade das teleóginas de *B. microplus* coletadas em bovinos com parasitemia por *B. argentina* superior a 5%.

Pelos estudos realizados por ANTHONY et al. (1970),

foi evidenciado uma grande interferência do parasitismo por *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910) na longevidade e potencial reprodutivo de fêmeas de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897). Os autores verificaram que as teleóginas coletadas após o desprendimento natural do hospedeiro vertebrado infectado, apresentaram-se com peso menor e capacidade de postura inferior, quando comparadas com fêmeas ingurgitadas em hospedeiro não infectado. Também foi constatada alta taxa de mortalidade das teleóginas ingurgitadas em equino infectado, entre o período de sete a 10 dias de incubação. Segundo os autores, alguns aspectos como o da redução no peso e o da taxa de eclosão dos ovos originados de fêmeas infectadas estavam associados a intensa multiplicação dos parasitos nos ovários e por conseguinte nos ovos.

MUANGYAI (1974), avaliando a taxa de infecção dos ovos de *B. microplus* infectados com *B. bigemina*, registrou acentuada redução na produção de ovos quando as fêmeas apresentavam um elevado número de merozoítas na hemolinfa. Resultado semelhante foi encontrado por EL ALLAWY (1977) ao estudar a taxa de infecção de ovos de *B. microplus* com infecção por *B. bigemina*. Esse autor também observou que os ovos obtidos nos primeiros três dias após o início da postura apresentaram uma taxa de infecção igual a zero.

Em estudos experimentais, DAVEY (1981) observou que a presença de *B. bovis* não interferiu significativamente no peso das fêmeas de *B. microplus*, embora as fêmeas não infecta-

das tivessem apresentado um pêso superior (409,3 mg) ao das fêmeas infectadas (395,6 mg). O período de pré-postura registrado no grupo de teleóginas não infectadas e infectadas não apresentaram grande diferença (3,7 e 3,8 dias, respectivamente). A massa de ovos obtida das fêmeas não infectadas (163,5 mg) foi significativamente maior do que as coletadas das fêmeas infectadas (93,1 mg). O período de postura apresentado pelo grupo das teleóginas não infectadas foi mais longo (15,7 dias), quando comparado com o grupo das teleóginas infectadas (8,8 dias). O período de incubação (26 dias) e a taxa de eclosão (85%) dos ovos coletados nos grupos das fêmeas não infectadas e infectadas não sofreram interferência da infecção por *B. bovis*.

DALGLIESH et al. (1981), ao estudarem a patogenicidade das cepas de *B. bovis* para *B. microplus*, observaram que 70% das teleóginas obtidas de bovinos infectados com cepa de *B. bovis* não modificada por passagens sucessivas em hospedeiro vertebrado apresentaram hemolinfas com coloração vermelho escuro. Tal alteração na cor da hemolinfa foi considerada como resultado da passagem de hemoglobina para hemolinfa, consequente a intensa destruição das células epiteliais do intestino do carapato durante a multiplicação dos parasitos. Verificaram também que tanto as teleóginas infectadas com cepas não modificada quanto as infectadas com cepas modificadas por passagens sucessivas em bovinos, apresentaram igualdade no número de vermículos encontrados nas amostras de hemolinfa. Entretanto, somente nas teleóginas infectadas com cepa não modificada foi regis-

trada grande taxa de mortalidade após o oitavo dia de incubação.

GRAY (1982) registrou taxa de mortalidade de 93 a 100% entre teleóginas de *B. microplus* obtidas de bovinos com uma parasitemia por *B. bigemina* entre 0,02 e 0,07%. As teleóginas que sobreviveram apresentaram um número reduzido de ovos em relação as fêmeas ingurgitadas no mesmo hospedeiro, porém antes da parasitemia. Após o período de incubação, tornou-se evidente o efeito da infecção na viabilidade e taxa de eclosão dos ovos.

GUGLIELMONE et al. (1985) observaram mortalidade de 70% das teleóginas de *B. microplus* que ingurgitaram em bovinos com parasitemia de 1,5% para *B. bovis* e 3,5% para *B. bigemina*. Entretanto, nos animais com grau de parasitemia de 1,5% por *B. bovis* e *B. bigemina*, a taxa de mortalidade foi reduzida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do Experimento

O presente experimento foi desenvolvido nos laboratórios da Área de Parasitologia na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. A UFRRJ, está situada entre os paralelos 22°41' 22°45' de latitude sul e os meridianos 43°38 , 43°42 , de longitude oeste de Greenwich a uma altitude de 33 metros do nível do mar, apresentando um clima tipicamente tropical. No período de realização do experimento a temperatura média anual foi de 29,75°C, precipitação média anual de 98,97 mm e umidade relativa média anual de 70,5%.

3.2. Obtenção dos Animais

Nestes estudos foram utilizados quatro animais mes-

tiços *Bos taurus* x *Bos indicus*, machos e fêmeas entre 6 e 8 meses de idade. Do total de animais utilizados, dois foram obtidos da fazenda Vista Alegre, localizada no Planalto do Itatiaia a 22°44' de latitude sul e 44°60' de longitude oeste, a 2.400 metros acima do nível do mar.

O planalto é limitado ao sul pelas cadeias rochosas das Prateleiras, Pedra Assentada e Serra do Canto. Esta região é percorrida em uma extensão de 10 km pelo Rio das Flores, onde atravessa toda a área meridional do planalto. A região norte abrange as nascentes dos rios Aiuruoca e Preto e está localizada parcialmente no Estado de Minas Gerais. Nesta região existem três faixas climáticas (BARTH, 1957), com início a 400 metros do Vale do Paraíba alcançando as Prateleiras, 2.787,4 metros de altitude. De acordo com a descrição do autor a primeira faixa é considerada uma zona tropical, tendo início às margens do Rio Paraíba, onde ocorre uma pequena elevação do terreno, formando pequenas colinas. Esta faixa apresenta um clima tropical, com verão úmido e inverno seco. A segunda faixa considerada como subtropical, apresenta uma área de mata entre 600 e 800 até 2.100 metros de altura. Nesta faixa há uma área de mata tropical entre 1.600 a 2.100 metros. A partir do limite superior há uma terceira faixa, com características tipicamente de campo, podendo ser observado arbustos nas áreas úmidas. No inverno a temperatura mínima chega a 6°C abaixo de zero, no verão pode atingir 1°C nas primeiras horas do dia. O índice pluviométrico ao verão apresenta uma média mensal de 306,404 mm,

porém no inverno pode ser registrado uma média mensal de 50 mm.

As condições climáticas registradas na terceira faixa, constituem fatores limitantes a biologia do carrapato *Boophilus microplus*, o que nos permitiu a utilização de animais livres de *Babesia* spp. e outros protozoários que tem como vetor este carrapato.

No mesmo período dois animais jovens, com cinco a seis meses de idade foram obtidos no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Estes animais foram criados em regime de estabulação permanente sobre ripado de madeira livres de carrapatos.

3.3. Manutenção dos Animais em Experimento

Antes da realização do experimento várias medidas foram adotadas para avaliar as condições clínicas e sanitárias dos animais. Inicialmente os animais foram banhados com produto carrapaticida piretróide a base de decametrina¹ [(S) - alfa-ciano-3-fenoxibenzil CIS - (IR 3)-2,3-dimetil-3-(2.2-dibromovinil) ciclopropanocarboxilato] na concentração de 25 ppm, para eliminar uma possível infestação ocorrida durante o transporte. Foram realizados exames de fezes de cada animal para o diagnóstico de helmintos e protozoários intestinais e posteriormente tratados

¹ Butox P^r - Químio Roussel.

com drogas específicas contra tais parasitos.

Para avaliar o quadro hematológico dos animais foram coletadas amostras de sangue em tubos de vacutainer EDTA e processado em "Coulter Counter"² veterinário. A leitura do volume globular foi efetuado das amostras coletadas em tubos capilares heparinizados, processados em centrífuga para microhematócrito³.

Todas as medidas adotadas para avaliar as condições clínicas e sanitárias dos animais foram repetidas mensalmente até o final do experimento, exceto os banhos, que foram realizados de 12 em 12 dias até o início das infestações experimentais.

A pesquisa de *Babesia* spp. e outros hematozoários foi realizada através da confecção de esfregaços sanguíneos, sendo utilizada a primeira gota de sangue, obtida por punção de vasos de pequeno calibre do pavilhão auricular. Os esfregaços foram corados pelo método de Giemsa, com o seguinte procedimento: os esfregaços sanguíneos previamente secos ao ar e posteriormente fixado em metanol foram colocados em vasos coplin contendo solução diluída de corante Giemsa, e mantidos por um período de 1 a 2 horas. Para o preparo da solução foram utilizados III gotas da solução corante estoque de Giemsa 4 para 1 ml

² Coulter Counter-Eletrônico Mod. DN.VET.

³ Centrífuga Microhematócrito - FANEM.

⁴ MERK-DARMSTADT.

de solução fosfatada tamponada pH 7,2. Após o período de coloração, os esfregaços foram lavados com água corrente e, após a secagem, os esfregaços foram examinados com microscópio⁵ óticos com objetivas de 10X, 40X, 100X e neste caso com auxílio de óleo de imersão e ocular de 10X, dando maior atenção aos bordos laterais e a região final dos esfregaços, onde teoricamente ocorre uma maior concentração de parasitos.

Para complementar o exame realizado através de esfregaços sanguíneos, todos os animais foram submetidos ao teste de imunofluorescência indireta e observação diária da temperatura retal. Os animais considerados livres de infecção por *Babesia* spp. ao término de todos os exames foram mantidos em isolamentos, constituído de baias individuais medindo aproximadamente 5 m², tendo o piso de cimento liso, sobre o qual foi colocado um estrado de madeira para dar proteção as teleóginas, evitando que ao desprenderem-se do hospedeiro fossem pisoteadas. Todas as baias foram fechadas com tela milimetrada a prova de carrapatos e insetos. No ponto de união entre a parede de alvenaria e o quadro de madeira utilizado para sustentação da tela, foi colocado uma camada de 2 cm de vaselina sólida para impedir a passagem de larvas de carrapato.

A alimentação básica utilizada para os animais consistiu de ração balanceada para bezerros, sal mineral e água à vontade.

⁵ WILD-M20.

3.4. Obtenção e manutenção de larvas de *B. microplus* livres de *B. bigemina* e *B. bovis*

A metodologia utilizada para criação e manutenção da colônia de carrapato *B. microplus* foi baseada no trabalho de NEITZ, BOUGHTON & WALTERS (1971) modificada, utilizando-se seringas de plástico descartáveis.

Inicialmente foram utilizadas 350 fêmeas ingurgitadas (teleóginas) de *B. microplus* coletadas de bovinos mestiços mantidos no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

No laboratório, as fêmeas ingurgitadas foram lavadas com água corrente, secadas em papel de filtro, selecionadas de acordo com o peso médio e capacidade de movimentação. Em seguida, foram distribuídas em grupos de 10, por placa de petri (100 x 20 mm) contendo papel de filtro umedecido com água. Posteriormente, as placas de petri foram identificadas e incubadas em câmara climatizada à temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%.

Com dois dias de postura, os ovos de várias teleóginas foram coletados, homogeneizados e pesados em balança analítica⁷. Durante a pesagem, parte dos ovos foram separados em lo-

⁶ Estufa incubadora para BOD - Mod. 347 - FANEM.

⁷ Balança Sartorius - 1213P.

tes de 0,2 g, acondicionados em seringas plásticas descartáveis adaptadas para criação de carrapatos. A adaptação consistiu na retirada da extremidade anterior que passou a ser fechada com tecido de algodão tipo "popeline". As seringas com os ovos acondicionados foram identificadas e mantidas em câmara climatizada, à temperatura e umidade relativa igual a utilizada para a manutenção das teleóginas. Para evidenciar uma possível transmissão de *Babesia* spp. para os ovos, amostras destes foram coletadas para confecção de macerados em lâminas de vidro para microscopia; os macerados foram corados pelo método Giemsa e examinados com microscópio ótico com objetiva de 100X e ocular de 10X.

Dez dias após a eclosão, as larvas foram utilizadas para a infestação de animais sensíveis, livres de *Babesia* spp., onde cada bezerro foi infestado com aproximadamente 40.000 larvas.

A finalidade das infestações foi verificar se as larvas obtidas estavam negativas, reforçando assim a primeira prova realizada com as amostras de ovos. De larvas livres de infecção se obteve, por consequência, teleóginas não infectadas para manutenção da colônia e estudo biológico da *Babesia* spp. no carrapato vetor. Todos os animais infestados foram controlados diariamente através de exame clínico, esfregaço sanguíneo, avaliação da temperatura retal e volume globular.

3.5. Obtenção e manutenção de larvas de *B. microplus* infectadas com *B. bigemina* e *B. bovis*

A técnica aplicada na obtenção de larvas infectadas foi baseada nos trabalhos de THOMPSON (1976) e MAHONEY & MIRRE (1977).

Para obtenção de larvas infectadas, foi utilizado um bezerro mestiço (nº 340), com seis meses de idade. O bezerro foi mantido em isolamento durante todo o experimento. As infestações foram realizadas, por um período de 12 dias consecutivos com 0,2 g de larvas de *B. microplus* (aproximadamente 4.000 larvas), livres de *Babesia* spp.

Quinze dias após a primeira infestação, o bezerro foi inoculado com 20 ml de sangue bovino infectado com *B. bovis* e *B. bigemina* por via endovenosa, permitindo assim, que a parasitemia provocada pelo sangue inoculado viesse a coincidir com o ingurgitamento das fêmeas originadas das infestações iniciais.

As teleóginas que desprenderam-se naturalmente, foram coletadas no piso e levadas para o laboratório onde receberam o mesmo tratamento adotado para as teleóginas não infectadas. Posteriormente a seleção, as fêmeas foram mantidas em placas de petri (100 x 20 mm) fixadas em fita adesiva para permitir a seleção dos ovos originados das teleóginas infectadas.

Os ovos utilizados foram obtidos no período de seis

a 12 dias após o início da postura, a partir de teleóginas comprovadamente infectadas, pela observação da presença de esporozoítas (vermiculos) em esfregaços de hemolinfa. Tais esfregaços foram tratados com metanol e corados pelo método Giemsa. Com auxílio de um pincel fino, os ovos foram coletados, pesados, separados em amostras de 1 grama (aproximadamente 20.000 ovos) e acondicionados em seringas de plástico descartáveis adaptadas para a criação e manutenção dos carrapatos. Em seguida, identificadas e incubadas em câmara climatizada a temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%.

Para manutenção das larvas durante o experimento, foi infestado o bezerro mestiço n° 358, macho, com seis meses de idade e não esplenectomizado. A metodologia utilizada para esta infestação foi a mesma aplicada anteriormente para o bezerro n° 340. As larvas foram mantidas em laboratório por um período de 20 dias pós eclosão, sob as mesmas condições de temperatura e umidade, para serem utilizadas posteriormente em outras infestações.

3.6. Infecção experimental dos carrapatos

O bezerro mestiço n° 359 macho, não esplenectomizado, foi utilizado para o experimento. Inicialmente o bezerro foi infestado durante 12 dias consecutivos, com 0,2 g de larvas de *B. microplus* (aproximadamente 4.000 larvas) livres de *Babesia* spp. Após a última infestação foi realizado uma segunda infes-

tação onde o bezerro recebeu 0,5 g de larvas de *B. microplus* (aproximadamente 10.000 larvas) infectadas com *Babesia* spp.

Com o aparecimento das primeiras formas no sangue periférico, o bezerro foi inoculado com Dexametazona 8 por via intramuscular na dosagem de 0,5 mg por kilo de peso por um período de 10 dias consecutivos. O uso desta droga teve como finalidade aumentar o período e o grau de parasitemia, permitindo assim, um maior tempo de exposição dos eritrócitos infectados às teleóginas.

No laboratório, as teleóginas após desprenderem-se naturalmente do hospedeiro, foram lavadas com água corrente, secadas em papel de filtro e acondicionadas em tubos de vidro. Os tubos foram fechados com algodão hidrófilo, identificados e acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%. As teleóginas permaneceram incubadas por um período de 30 dias, tempo necessário para a conclusão do experimento.

Durante o período de infecção, os bezerros foram acompanhados através da observação clínica, temperatura retal e exame de esfregaço de sangue periférico. Os esfregaços foram utilizados para analisar a presença e o grau de parasitemia do bezerro.

3.7. Métodos e avaliação da infecção das teleóginas

3.7.1. Exame da hemolinfa

A metodologia aplicada ao diagnóstico das formas evolutivas de *B. bigemina* e *B. bovis* foi baseada na técnica descrita por BURGDORFER (1970).

Com os objetivos de evidenciar a presença de merozoítas (vermículos) de *B. bigemina* e *B. bovis* e o seu comportamento no carrapato *B. microplus*, foram examinados através dos esfregaços de hemolinfa de 100 teleóginas que ingurgitaram e desprenderam-se naturalmente do hospedeiro vertebrado (bezerro n° 359) no período em que a parasitemia observada era de 0,4% para *B. bovis* e 1,3% para *B. bigemina*.

Os esfregaços de hemolinfa foram preparados a partir da secção da região distal (tarso e/ou tibia) de uma ou mais patas das teleóginas com auxílio de tesoura para cirurgia ocular, por um período de 17 dias consecutivos. As amostras de hemolinfa, foram depositadas em lâminas de vidro para microscopia previamente identificadas, secadas em temperatura ambiente, fixadas em metanol por um período de três minutos e coradas pelo método de Giemsa por 40 minutos. Sendo o tempo de coloração reduzido para 25 a 30 minutos quando os esfregaços apresentavam-se com maior espessura.

No preparo da solução diluída de Giemsa foram utilizadas III gotas da solução estoque para 1 ml de solução tam-

pão pH 7.2. Após a coloração, as lâminas foram examinadas em microscópio ótico, utilizando-se objetivas de 10X, 40X, 100X e ocular de 10X.

Para melhor conservação do material, cada lâmina recebeu uma gota de balsamo do Canadá⁹ e em seguida uma lamínula de vidro.

3.7.2. Cálculo do grau de infecção das teleóginas

Para calcular o grau de infecção das teleóginas foi utilizado como referência básica o trabalho de FRIEDHOFF & SMITH (1981).

As amostras de hemolinfa coletadas para o estudo do comportamento das formas evolutivas de *Babesia* spp. também foram utilizadas para o cálculo do grau de infecção das teleóginas de *B. microplus*. O exame do material foi realizado diariamente, utilizando-se objetivas de 100X e ocular de 10X. Para tal, estabeleceu-se o seguinte critério:

Grau 1	-	1	a	5	vermiculos	(esporozoítas)	por	esfregaço
Grau 2	-	6	a	50	vermiculos	(esporozoítas)	por	esfregaço
Grau 3	-	50	a	100	vermiculos	(esporozoítas)	por	campo
Grau 4	-	+	de	100	vermiculos	(esporozoítas)	por	campo

⁹ Merk Darmstadt

3.7.3. Exame dos órgãos internos

As teleóginas de *B. microplus* utilizadas para o estudo do comportamento das formas evolutivas de *B. bovis* e *B. bigemina* nos órgãos internos (intestinos, túbulos de malpighi e ovários), foram coletados do mesmo hospedeiro (bezerro 359) no mesmo período em que foram coletadas as teleóginas para o estudo dos esporozoítas na hemolinfa. Após a seleção, as teleóginas foram incubadas em câmara climatizada a temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%.

As amostras dos órgãos internos foram coletadas de 80 teleóginas durante um período de 96 horas. Nas primeiras 24 horas as amostras foram coletadas com intervalos de seis horas, passando em seguida para intervalos de 24 horas.

Para a extração dos órgãos internos, foram utilizados tesoura de ponta fina, alfinetes e pinças entomológicas e microscópio estereoscópico¹⁰. A teleógina viva, foi depositada com a superfície dorsal voltada para cima sobre uma placa de petri (100 x 20 mm) contendo no seu interior uma camada de 1,5 cm de parafina sólida. Em seguida, foram imobilizadas com auxílio de dois alfinetes entomológicos transfixando a região entre o escudo e a base do gnathosoma. Com a tesoura foi realizado uma incisão no sulco marginal contornando totalmente o **i-**

¹⁰ CARL ZEISS

diosoma. Para rebater o tegumento dorsal, foi efetuado um corte no sentido transversal junto a região mediana do escudo. Posteriormente a remoção do tegumento, a cavidade geral foi banhada com solução fisiológica a temperatura de 5°C, aumentando consideravelmente a consistência dos órgãos a serem coletados. Para confecção dos esfregaços, os órgãos foram coletados separadamente, lavados em solução salina por alguns segundos e depositados em lâminas de vidro para microscopia, previamente identificadas.

Os esfregaços previamente secos ao ar e posteriormente tratados com metanol foram corados pelo método de Giemsa.

3.7.4. Exame de ovos e larvas

As amostras de ovos utilizados para caracterizar as formas evolutivas de *Babesia* spp. foram obtidas das teleóginas selecionadas para a realização dos estudos sobre o comportamento dos merozoítas em hemolinfa. Ovos de final de postura originados de teleóginas comprovadamente positivas foram coletados e mantidos em câmara climatizada a temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%. A coleta e processamento das amostras foram realizadas durante todo o período de incubação dos ovos, com intervalos de 24 horas.

Posteriormente a eclosão, 10 amostras de larvas não alimentadas foram coletadas durante um período de 10 dias consecutivos. Para cada amostra foram coletadas cinco larvas. Dez

amostras de larvas alimentadas foram coletadas do bovino n° 362 com intervalos de 24 horas, durante quatro dias consecutivos a partir do primeiro dia de infestação. O número de larvas alimentadas utilizadas para cada amostra foi igual ao utilizado anteriormente para as amostras de larvas não alimentadas.

A fixação, coloração e exame das amostras de ovos e larvas não alimentadas e alimentadas foram realizadas obedecendo os critérios adotados para o processamento das amostras dos órgãos internos.

3.7.5. Estudos morfométricos das formas evolutivas de *B.*

bovis e *B. bigemina*

A identificação morfométrica das formas evolutivas de *Babesia* spp. foi baseada nos trabalhos de RIEK (1964, 1966) e MORZARIA & BROCKLESBY (1977).

Para os estudos morfométricos no hospedeiro vertebrado foram confeccionados esfregaços de sangue periférico. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados pelo método de Giemsa.

Do hospedeiro invertebrado, foram utilizados esfregaços de hemolinfa, macerados de intestino, túbulos de malpighi e ovários, como também amostras de ovos com diferentes dias de incubação também foram utilizadas. Todo o material originado do hospedeiro invertebrado foi fixado em metanol e corado pelo método de Giemsa.

Os aspectos morfométricos das formas de *B. bovis* e *B. bigemina* encontradas no hospedeiro vertebrado e invertebrado foram estudados com microscópio Wild M.20, utilizando-se objetivas de 10X, 40X, 100X e ocular de 10X. As medidas foram tomadas com ocular micrométrica SK 15 Wild.

As fotomicrografias das formas evolutivas foram realizadas em microscópio Dialux 20 EB, acoplado com câmara fotográfica MPS 51, utilizando-se filme Kodacolor URG Kodak, 35 mm, 100 ISO, 21 DIN. O tempo de exposição foi medido com fotômetro automático Wild MPS 55.

3.8. Cálculo da parasitemia

O cálculo da parasitemia dos bovinos em experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura (1985).

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados a partir da punção dos vasos de pequeno calibre na região do pavilhão auricular, fixados, tratados com metanol e corado pelo método Giemsa. Após um exame geral do esfregaço, foram selecionados seis campos que apresentaram os eritrócitos com uma distribuição uniforme. O total de eritrócitos de cada campo foi somado e em seguida calculado a média. Para calcular a percentagem de eritrócitos infectados com *B. bovis* foi necessário dividir o valor constante (10.000) pela média de eritrócitos não infectados. Para o cálculo da percentagem de eritrócitos infectados

com *B. bigemina* foi aplicado o mesmo critério, modificando apenas para 5.000 o valor da constante. Após examinar todos os campos, foram somados o número de eritrócitos infectados e calculados os percentuais de células infectadas.

Os esfregaços sanguíneos foram examinados, utilizando-se microscópio ótico com objetiva de 100X e ocular de 10X.

3.9. Efeitos da infecção de *Babesia* sp. sobre teleóginas de *B. microplus*

Para a realização desta fase experimental, foi utilizado o bovino mestiço nº 362, fêmea, com oito meses de idade. Inicialmente este bovino foi infestado experimentalmente por um período de 15 dias consecutivos com 0,2 g de larvas de *B. microplus* (aproximadamente 4.000 larvas), livres de *Babesia* spp.

Doze dias após a primeira série de infestações, foi realizado uma segunda infestação com 0,5 g de larvas de *B. microplus* (aproximadamente 10.000 larvas), infectadas com *Babesia* spp.

As teleóginas originadas das primeiras infestações (grupo negativo), desprendidas naturalmente do hospedeiro, foram coletadas pela manhã, entre sete e oito horas.

No laboratório, as teleóginas foram lavadas, secadas em papel de filtro e selecionadas de acordo com a sua capacidade de movimentação. Em seguida, foram pesadas individual-

mente em balança analítica e acondicionadas em tubos de vidro (100 mm de diâmetro x 200 mm de altura) fechados com rolha de algodão hidrófilo. Os tubos foram identificados e incubados em câmara climatizada com temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%.

Um segundo grupo de teleóginas (grupo positivo) composto por 190 exemplares foram coletados do mesmo hospedeiro, no período em que a parasitemia observada foi de 0,01 para *B. bovis* e 0,1 a 0,3% para *B. bigemina*. A seguir, as teleóginas foram tratadas de acordo com a metodologia utilizada para o grupo negativo.

Para a seleção das teleóginas não infectadas e infectadas com *Babesia* spp., foram confeccionados esfregaços de hemolinfa de todas as teleóginas, com sete a 10 dias de incubação. Para obtenção da hemolinfa, foi utilizado a mesma técnica descrita para o estudo da presença e comportamento de *Babesia* spp. em teleóginas de *B. microplus*. Somente as fêmeas no qual o parasito foi encontrado, foram avaliados no grupo positivo. Tanto as teleóginas do grupo não infectado quanto as pertencentes ao grupo infectado, foram avaliadas através de: peso inicial das teleóginas, período de pré-postura, período de postura, peso da massa de ovos, período de incubação e percentual de eclosão dos ovos.

A taxa de infecção e de mortalidade das teleóginas foi avaliada utilizando-se dois grupos de 100 fêmeas de *B. microplus* obtidas de dois hospedeiros (n° 359 e n° 362) com di-

ferentes graus de parasitemia.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Hospedeiro vertebrado

4.1.1. Sangue periférico

Nos exames realizados das amostras de sangue periférico coletados dos animais experimentalmente infectados (número 359 e 362) ; após o período de 20 dias de incubação, os parasitos encontrados no interior dos eritrócitos destes animais apresentavam-se no inicio da parasitemia com aspectos piriformes, pareados ou simples, arredondados, ameboides e raramente com formas alongadas e/ou bizarras (Fig. 1 e 2). Com a elevação da parasitemia verificou-se um aumento acentuado no número de formas ameboides, alongadas e bizarras, embora tenha sido registrado a predominância das formas piriformes pareadas. Células infectadas com quatro formas piriformes de *B. bigemina* foram observadas, porém com raríssima freqüência. Resultados semelhantes foram obtidos por RIEK (1964, 1966), embora neste tra-

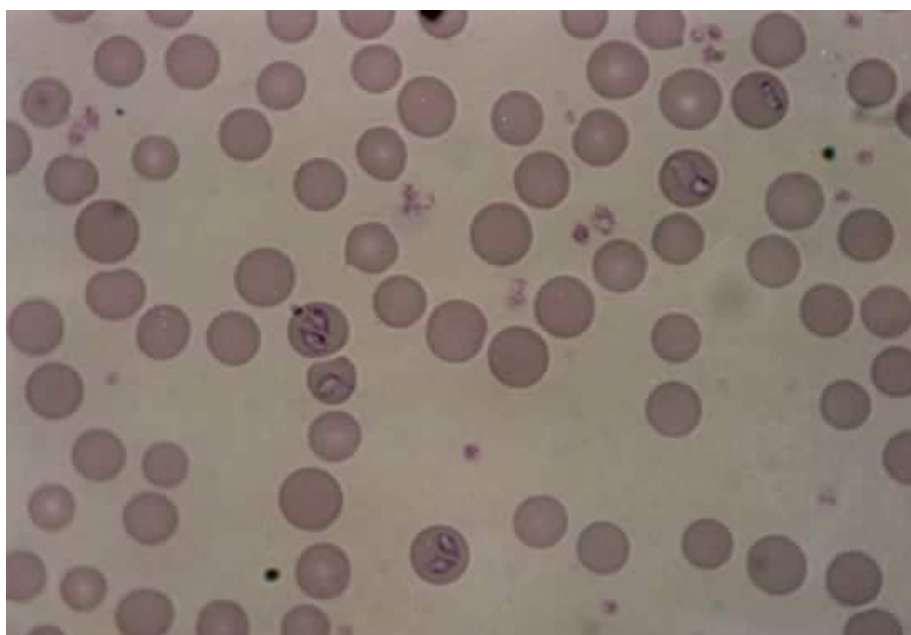


FIGURA 1. Merozoítas de *Babesia bigemina* em eritrócitos de bovino com infecção experimental. Esfregaço de sangue periférico corado pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

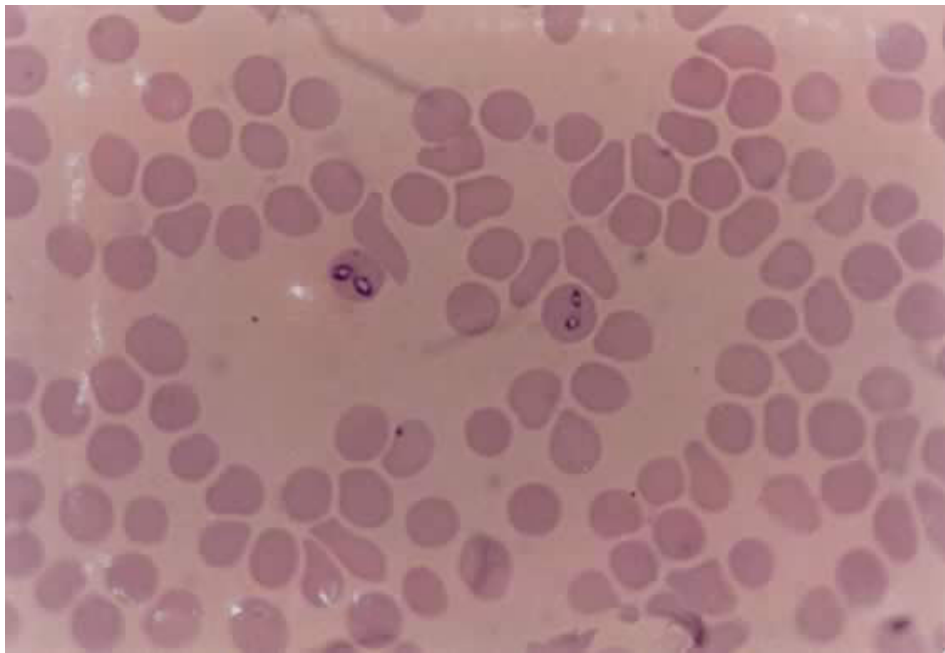


FIGURA 2. Merozoítas de *Babesia bovis* em eritrócitos de bovino com infecção experimental. Esfregaço de sangue periférico corado pelo método Giemsa. (Oc. 10X, Obj. 100X).

balho não tenha sido descrito a infecção múltipla dos eritrócitos, bem como a relação do número de formas, ameboides, alongadas e bizarras com o grau de parasitemia do hospedeiro vertebrado.

Nas amostras coletadas do bezerro número 359 foram encontrados algumas formas livres no plasma sanguíneo, principalmente quando o nível de parasitemia apresentou-se elevado: 1,3% para *B. bigemina* e 0,4% para *B. bovis*. Estes dados foram obtidos em relação as duas espécies do gênero *Babesia* utilizadas no experimento, porém com menos intensidade para *B. bovis*.

As mensurações obtidas das formas piriformes pareadas de *B. bigemina* variaram de 4,2 - 4,4 um de comprimento e 2,0 - 2,6 um de largura, sendo que a média encontrada foi de 4,3 um x 2,2 um; para *B. bovis* entre 2,1 - 2,5 um de comprimento e 1,0 - 1,5 um de largura com média de 2,5 um x 1,2 um. Estes dados estão de acordo com as observações de RIEK (1964, 1966) e MEHLHORN & SCHEIN (1984).

4.2. Hospedeiro invertebrado

4.2.1. Tubo digestivo

Todas as formas evolutivas de *B. bigemina* e *B. bovis* encontradas nas amostras de sangue periférico do hospedeiro vertebrado foram também observadas nos esfregaços de conteúdo intestinal das teleóginas de *B. microplus* durante as primeiras ho-

ras após a queda natural do hospedeiro (Fig. 3), concordando com as observações de RIEK (1964, 1966), DENNIS (1932) e STEWART et al. (1986).

O número de formas exocitrocíticas encontradas neste material alcançou valores superiores aos registrados em esfregaços de sangue periférico. O aumento destes valores foram atribuídos principalmente à ação do parasito sobre a célula hospedeira, obedecendo uma sequência evolutiva natural, além dos efeitos físicos e químicos produzidos pelo meio.

Nas primeiras 24 horas um grande número de parasitos com formas arredondadas, foram observados no interior dos eritrócitos. Estes apresentavam um vacúolo central envolvido por uma delgada camada de citoplasma corado de azul claro e um núcleo vermelho escuro localizado na região periférica. Posteriormente à ruptura dos eritrócitos, o núcleo apresentou-se distribuído uniformemente em torno do parasito, dividindo-se imediatamente em dois ou quatro pontos; cada estrutura recebeu um envoltório citoplasmático para em seguida modificar-se para formas arredondadas e claviformes. Com este resultado foi possível estabelecer uma sequência evolutiva destes parasitos no conteúdo intestinal posteriormente a um período de 24 horas de incubação. Estas estruturas foram também observadas por RIEK (1964, 1966) para *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente, e associadas ao desenvolvimento dos parasitos. Mesmo com a obtenção destes resultados, este autor não considerou como uma sequência evolutiva, semelhante a descrita neste experimento,

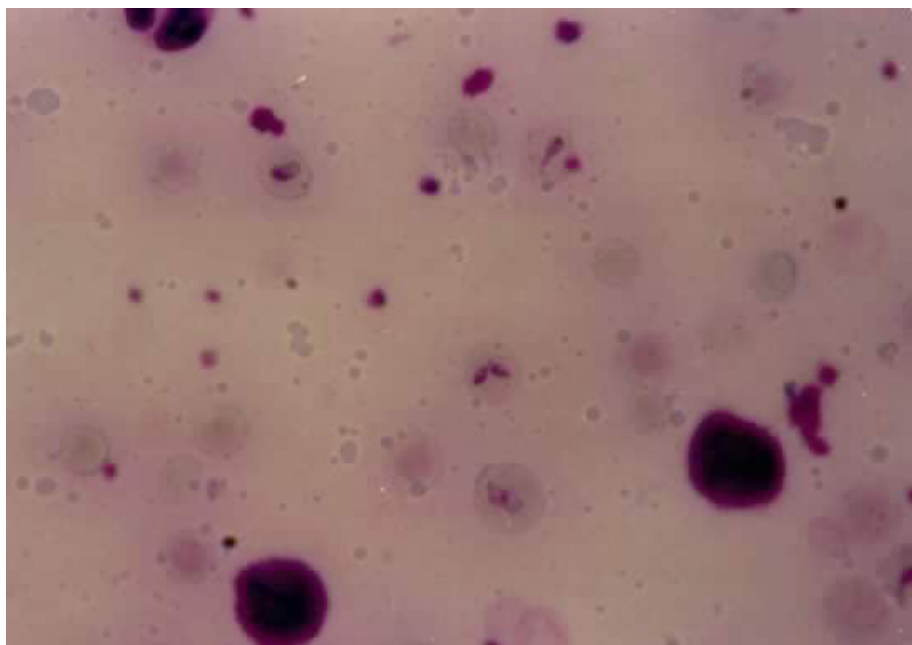


FIGURA 3. Merozoítas de *Babesia bigemina* em eritrócitos de bovinos em conteúdo intestinal de teleógi-na de *Boophilus microplus* seis horas pós-que-da. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10x. Obj. 100X).

sim como formas isoladas do parasito.

Os parasitos com aspectos claviformes foram encontrados no conteúdo intestinal das teleóginas após um período de 24 a 48 horas de incubação. Estas formas medindo entre 11,6-12,8 um de comprimento e 3,6 - 4,8 um de largura com a média de 12,9 x 4,12 um, era constituído de um núcleo central, arredondado, corado fortemente de vermelho, geralmente localizado na região mediana. Algumas vezes foi encontrado levemente deslocado para a região posterior. O citoplasma corado de azul claro apresentava um grande vacúolo na extremidade anterior, porém pode ser constituído de pequenos vacúolos distribuído em toda a sua extensão (Fig. 4). Posteriormente estas formas sofriram um processo evolutivo, passando a apresentar uma dilatação da extremidade anterior. Nestes parasitos com aspecto arredondado observou-se uma massa nuclear densa corada de vermelho escuro, localizada na região mediana, e o citoplasma com uma distribuição uniforme corado de azul claro. Este processo evolutivo persistiu até a total modificação das formas vermiculares em estruturas arredondadas. A massa de cromatina observada nestas formas arredondadas distribuiu-se para a periferia do parasito, dividindo-se em vários fragmentos. Cada fragmento recebeu um envoltório citoplasmático, adquirindo uma forma arredondada e posteriormente vermicular (oocineto). Os oocinetos apresentavam-se com núcleo central corado de vermelho escuro, medindo 2,5 um de diâmetro, um rico material citoplasmático corado de azul distribuído uniformemente em toda sua extensão e

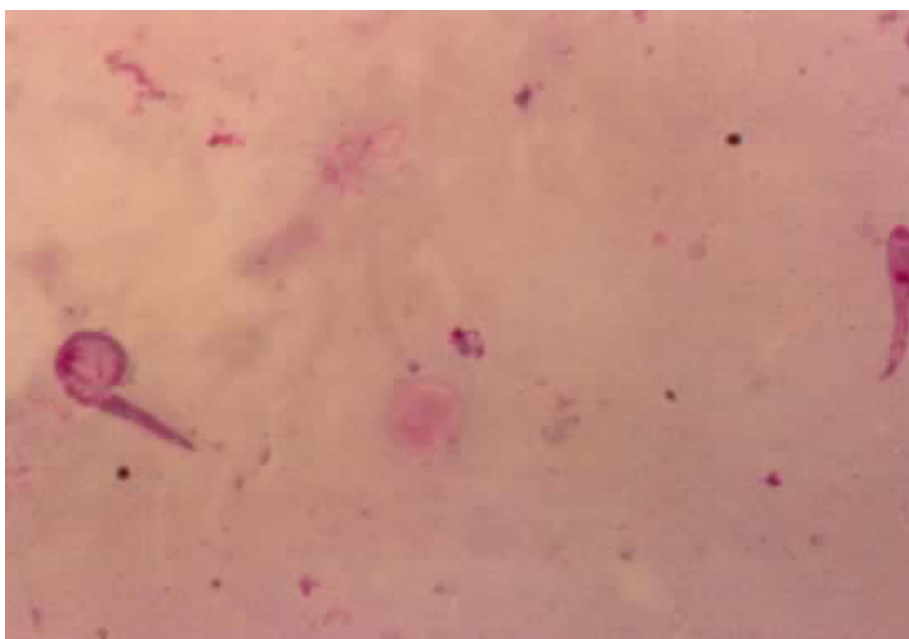


FIGURA 4. Formas de *Babesia* spp. em desenvolvimento no conteúdo intestinal de teleóquina de *B. microplus* com 24 a 48 horas de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

uma massa de cromatina vermelha localizada na extremidade anterior (denominada de "cape"), idêntica ao observado no núcleo. As mensurações registradas, variavam entre 10,15 - 11,5 um de comprimento e 9,0 - 9,8 um de largura com média de 10,86 um x 0,39 um (Fig. 5).

Tais formas foram observadas primeiramente por KOCH (1906) em amostras de intestino de teleóginas de *B. australis*, *R. evertsi* e *H. aegyptium* infectadas com *B. bigemina*. CRAWLEY (1915) encontrou corpos em forma de charuto em intestinos de teleóginas de *B. annulatus* infectados com *B. bigemina*, e considerou estas formas idênticas às observadas por KOCH (1906). ROSEMBUCH (1927), também descreveu o desenvolvimento de *B. bigemina* em teleóginas de *B. microplus* e observou que as formas claviformes encontradas no intestino do vetor, apresentavam a capacidade de movimentação e infecção das células intestinais. DENNIS (1932) descreveu a presença destes parasitos em forma de clava em conteúdo intestinal de teleóginas de *B. annulatus* infectadas com *B. bigemina*, e concluiu que a origem destas formas (oocinetos) estão diretamente ligada a união de isogametas. PETROV (1941) descreveu o ciclo de *B. bovis* em teleóginas e caracterizou a fusão de isogametas na formação de oocinetos. Este resultado foi similar ao observado por DENNIS (1932) para *B. bigemina*. Posteriormente, MURATOV & KHEISIN (1959) estudaram o desenvolvimento de *B. bigemina* em *B. calcaratus* e observaram a presença de corpos em formas de clava na luz intestinal do vetor. Segundo os autores estas formas foram originadas

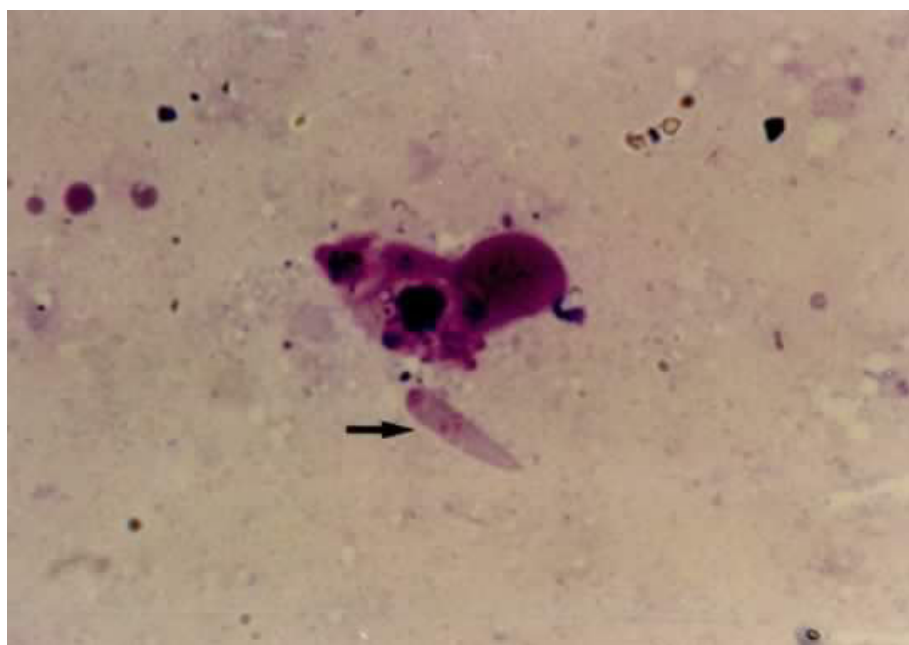


FIGURA 5. Oocineto de *Babesia* spp. em conteúdo intestinal de teleóquina de *B. microplus* com três dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

por DENNIS (1932) para *B. bigemina*.

Apesar dos aspectos morfológicos observados por estes autores serem idênticos aos encontrados nos resultados deste experimento, apenas os trabalhos realizados por RIEK (1964, 1966) para *B. bigemina* e *B. bovis* apresentaram uma maior identificação quando comparados aos aspectos morfológicos, e o fenômeno evolutivo que originou as formas claviformes (oocinetos).

As células raiadas foram observadas em amostras de conteúdo intestinal coletadas após o período de 24 a 48 horas de incubação. Estas formas apresentavam-se arredondadas com um citoplasma corado de azul escuro e um pequeno núcleo central de vermelho escuro. O número de flagelos observados variou entre cinco e oito, embora um maior número de formas tenham apresentado seis flagelos visíveis ao exame por microscopia ótica. As medidas encontradas foram de 2,5 - 3,0 um com a média de 2,63 um de diâmetro e o comprimento dos flagelos variaram entre 5,75 - 6,3 um com média de 5,9 um (Fig. 6). Estas células apresentaram grande semelhança com as descritas nos trabalhos de KOCH (1906), RIEK (1964), FRIEDHOFF & BUSCHER (1976).

Formas raiadas de *B. bigemina* (Strahlenkorper), semelhantes às observadas neste trabalho, foram descritas primeiramente por KOCH (1906) em estudos realizados com amostras de conteúdo intestinal de teleóginas com 24 horas de incubação. Neste trabalho o autor considerou estas formas como estágio sexual do parasito. RIEK (1964) observou a presença de formas

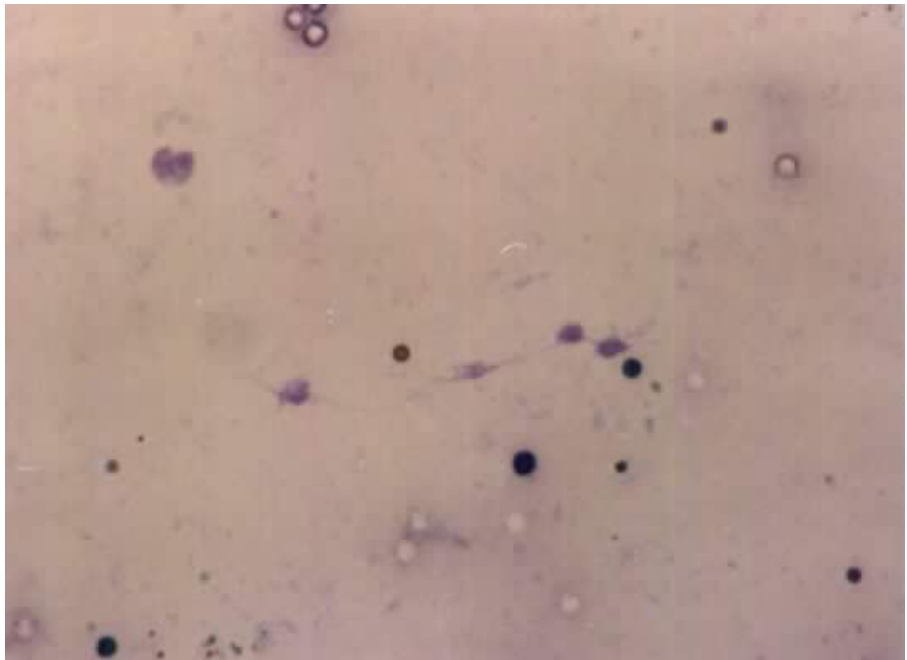


FIGURA 6. Células rajadas de *Babesia* spp. em conteúdo intestinal de teleóquina de *B. microplus* com 24 horas de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

raiadadas de *B. bigemina* em conteúdo intestinal de teleóginas de *B. microplus* com 24 horas de incubação e considerou como parasitos em degeneração. FRIEDHOFF & BUSCHER (1976) verificaram a presença de corpos raiados de *B. bigemina* em teleóginas de *B. microplus* e consideraram como um estágio envolvido na reprodução sexual do parasito. Posteriormente, WEBER & FRIEDHOFF (1977) e WATTENDORFF (1980) encontraram formas raiadas de *B. bigemina* com diferentes estágios evolutivos no conteúdo intestinal de teleóginas de *B. microplus* e relacionavam estas estruturas a um fenômeno de reprodução sexuada, semelhante ao observado por FRIEDHOFF & BUSCHER (1976). Estas formas também foram descritas por DALGLIESH et al. (1981) nas amostras de intestino de teleóginas de *B. microplus* infectadas com *B. bigemina*. Nestas amostras o número de corpos raiados observado foi maior durante as primeiras 24 horas de incubação, principalmente quando coletadas das teleóginas infectadas com cepas de *B. bigemina* modificadas por passagem sucessiva no hospedeiro vertebrado.

Após revisão da literatura, verificou-se que os resultados observados em vários trabalhos foram semelhantes, mesmos naqueles desenvolvidos em condições experimentais diferentes, e sugeriram as estruturas raiadas como formas sexuais, reforçando os dados obtidos neste experimento.

Entre o período de 48 a 72 horas, os oocinetos encontrados na luz intestinal penetraram nas células epiteliais do intestino, especificamente no citoplasma para realização de uma nova multiplicação. No interior da célula estes parasitos ad-

quiriram um aspecto fusiforme, com um núcleo central corado fortemente de vermelho e o citoplasma azul claro, semelhante ao da célula hospedeira. Em seguida modificavam-se para formas arredondadas, aumentavam de tamanho para posteriormente iniciar a divisão nuclear em vários fragmentos. Cada fragmento foi envolvido por um material citoplasmático, os quais evoluíram para formas arredondadas, ovais e finalmente vermiculares (Fig. 7), podendo algumas células apresentarem infecção múltipla.

As mensurações encontradas para as formas arredondadas, ovais e vermiculares variaram de 2,6 - 3,1 um com a média de 2,92 um de diâmetro, 4,1 - 4,85 um de comprimento e 2,81-3,15 um de largura com a média 4,43 um x 2,98 um, e 7,15 - 7,35 um de comprimento e 3,25 - 3,55 um de largura com a média de 7,25 um x 3,32 um, respectivamente.

No final deste período, os parasitos completavam o ciclo evolutivo no intestino, passando à formas vermiculares os quais rompiam a célula da parede intestinal migrando em seguida para luz intestinal e cavidade geral do carrapato. Várias formas foram encontradas em amostras de conteúdo intestinal após 72 horas de incubação das teleóginas. A coloração do núcleo, citoplasma e do "cape" observado nestas formas era idêntica ao descrito para os oocinetos.

Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos por RIEK (1964, 1966). PETROV (1941), MURATOV & KHEISIN (1959), STEWART et al. (1981), MEHLHORN & SCHEIN (1984) e STEWART et al. (1986), que também registraram a presença das for-

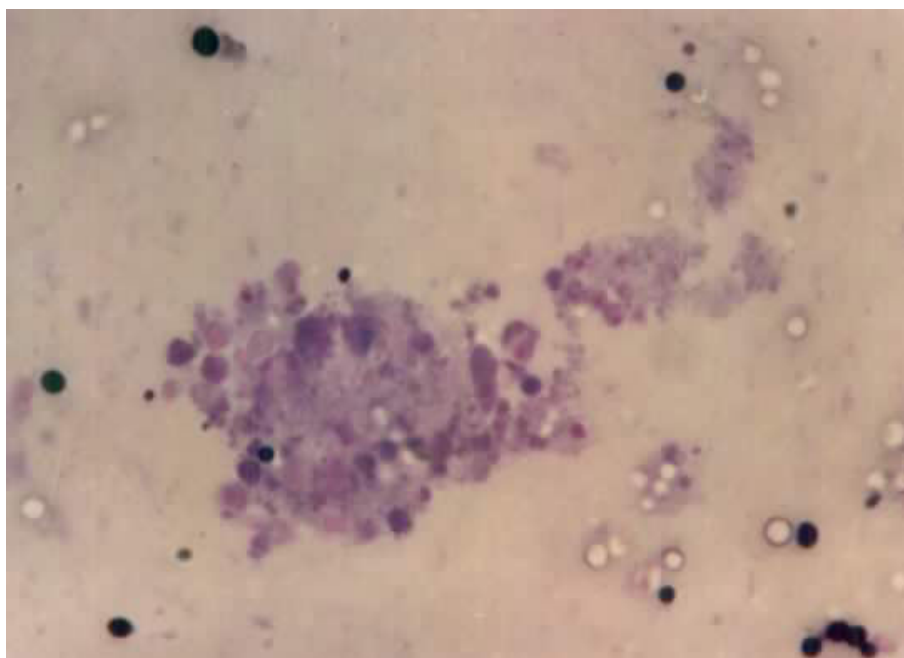


FIGURA 7. Formas em multiplicação de *Babesia* spp. na parede intestinal de teleóstina de *B. microplus* com 72 horas de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

mas vermiculares (oocinetos) e a sua multiplicação nas células epiteliais da parede intestinal, entretanto, sem estabelecer detalhes evolutivos e morfométricos do parasito.

4.2.2. Hemolinfa

4.2.2.a. Morfologia

Os primeiros esporozoítas imaturos de *B. bigemina* e *B. bovis* foram observados em amostras de hemolinfa coletadas de teleóginas de *B. microplus* com 72 a 96 horas de incubação, o que está de acordo com as observações de RIEK (1964, 1966) para *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente, e STEWART et al. (1986) para *B. bigemina*. No entanto, AKINBOADE & DIPEOLU (1981) observaram a presença de merozoítas de *B. bovis* em teleóginas de *B. geigy* a partir do quinto dia de incubação.

Os merozoítos imaturos de *B. bigemina* apresentavam-se com uma forma vermicular, possuindo um núcleo redondo corado fortemente de vermelho, localizado na extremidade posterior, embora em algumas formas tenham sido observado na região mediana; o citoplasma denso e bem distribuído, corado de azul claro em toda sua extensão. A massa de cromatina corado de vermelho escuro ("cape") apresentava-se na extremidade anterior do parasito (Fig. 8).

Estas mesmas descrições foram estabelecidas por RIEK (1964) ao caracterizar as formas vermiculares de *B. bigemina*



FIGURA 8. Diferentes estágios evolutivos de esporozoítas de *Babesia* spp. em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com quatro dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

nas fêmeas de *B. microplus*. Estes dados também foram encontrados por MORZARIA & BROCKLESBY (1977) ao caracterizar os aspectos das formas imaturas de *B. bigemina* em fêmeas de *B. microplus*.

As formas imaturas de *B. bovis* encontradas nas mesmas amostras de hemolinfa eram vermiculares, com um núcleo arredondado de coloração vermelho escuro, localizado próximo a região mediana, o citoplasma azul claro, denso e bem distribuído ao longo do parasito, a massa de cromatina corado de vermelho escuro está localizada na extremidade anterior. Verificou-se ainda que nesta espécie de *Babesia*, os esporozoítas apresentavam-se com a extremidade posterior recurvada, semelhante a um "gancho". Estas observações estão de acordo com as referidas por RIEK (1966).

Nos esporozoítas maduros de *B. bigemina* e *B. bovis* verificou-se um núcleo arredondado, corado fortemente de vermelho, localizado na região mediana; o citoplasma corado de azul claro constituído de pequenos vacúolos distribuídos em toda sua extensão, e uma reduzida massa de cromatina corado de vermelho escuro, disposta na extremidade anterior do parasito (Fig. 9). Observou-se ainda que com o aumento do período de incubação das teleóginas, os esporozoítas apresentavam uma redução no volume da massa de cromatina, até o total desaparecimento e, uma exarcebção no número e tamanho dos vacúolos citoplasmáticos, correspondendo às mesmas observações realizadas por RIEK (1964,



FIGURA 9. Esporozoitas de *Babesia bigemina* (A) e *Babesia bovis* (B) em hemolinfa de teleógina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

1966), MORZARIA & BROCKLESBY (1977) e EL-ALLAW (1977).

Formas imaturas e maduras dos merozoítas de *B. bigemina* e *B. bovis* foram observadas nas amostras de hemolinfa por um período de 17 dias. Durante este período foi registrado um acentuado número das formas maduras, principalmente a partir de 96 horas de incubação (Fig. 10). Nestes dados registrou-se ainda a predominância dos esporozoítas de *B. bigemina* (Fig. 9 e 10).

Das amostras de hemolinfa examinadas durante o experimento, apenas aquelas coletadas de teleóginas com três e quatro dias de incubação evidenciaram esporozoítas de *B. bigemina* (Fig. 11) e *B. bovis* no citoplasma dos hemócitos.

Nos estudos morfométricos dos esporozoítas maduros de *B. bigemina*, 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 - 16,05 um e 9,1 - 11,35 um respectivamente. Os valores médios observados variaram de 11,53 um a 12,67 um (Fig. 12). Nas mensurações das larguras, os valores paramétricos das maiores medidas variaram de 3,0 - 6,9 um e das menores medidas de 1,65 - 1,90 um, com dados médios variando de 2,48 um a 2,89 um (Fig. 13).

Nestas mensurações, observou-se que os valores paramétricos foram diferentes quando comparados aos resultados encontrados na literatura. Por exemplo: RIEK (1964) relatou que os vermículos maduros de *B. bigemina* mediram entre 9,0 - 13,0 um de comprimento e 2,0 - 2,9 um de largura com valor médio de 11,0 um x 2,5 um; MORAZARIA & BROCKLESBY (1977) estudando os aspectos



FIGURA 10. Esporozoitas de *Babesia bigemina*. Formas maduras (A) e imaturas (B) em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).



FIGURA 11. Esporozoitas de *Babesia bigemina* em hemócito de teleógina de *Boophilus microplus* com quatro dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

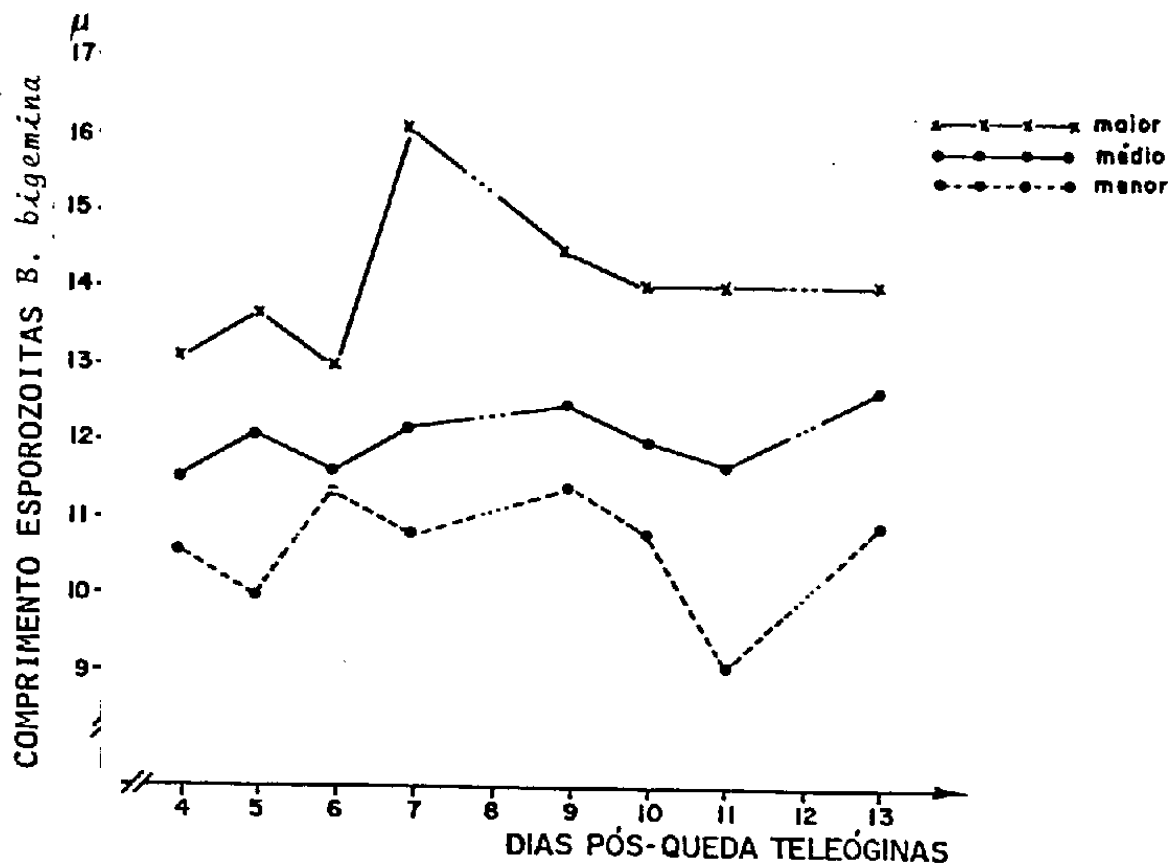


FIGURA 12. Variação do comprimento de esporozoítas de *Babesia bigemina* entre quatro e 13 dias pós-queda das teleóginas de *Boophilus microplus* indicando-se os valores paramétricos e média.

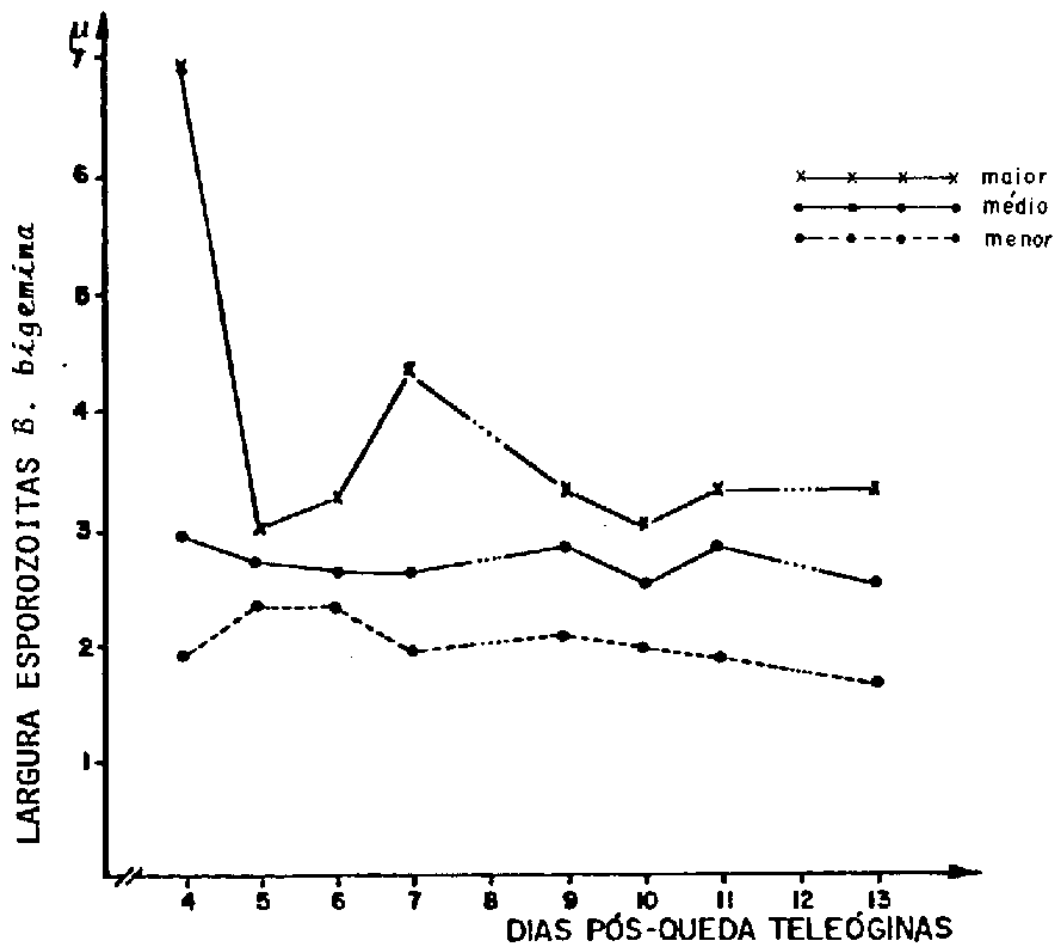


FIGURA 13. Variação da largura dos esporozoítas de *Babesia bigemina* entre quatro e 13 dias pós-queda das teleóginas de *Boophilus microplus* indicando-se os valores paramétricos e média.

morfométricos dos esporozoítas maduros de *B. bigemina* observaram que as medidas encontradas variaram entre 11,46- 12,12 um de comprimento e 2,45 - 2,65 um de largura com média de 11,79 um x 2,55 um. Observações estas que mais se assemelham aos valores médios descritos neste experimento; MEHLHORN & SCHEIN (1984) reportaram medidas de 11 u x 2,5 um para esporozoítas maduros de *B. bigemina*, resultado idêntico ao valor médio encontrado por RIEK (1964).

Os estudos morfométricos dos esporozoítas de *B. bovis* não foram realizados devido ao reduzido número das formas encontradas nestas amostras.

Nas mensurações realizadas para caracterização das espécies, os valores paramétricos obtidos por merozoítas de *B. bigemina* foram de 9,1 - 16,05 um de comprimento e, 1,9 - 6,9 um de largura com valores médios de 2,65 um x 12,05 um.

Para os esporozoítas de *B. bovis*, os valores encontrados variaram de 13,50 - 19,30 um de comprimento e 2,75- 4,0 um de largura com médias de 17,40 um x 3,46 um (Fig. 14). Estes valores não estão de acordo com os dados obtidos por RIEK (1966) e MEHLHORN & SCHEIN (1984).

Os resultados obtidos nas mensurações mostraram-nos que o período de incubação não interferiu significativamente no tamanho e largura dos esporozoitos de *B. bigemina* e *B. bovis*.

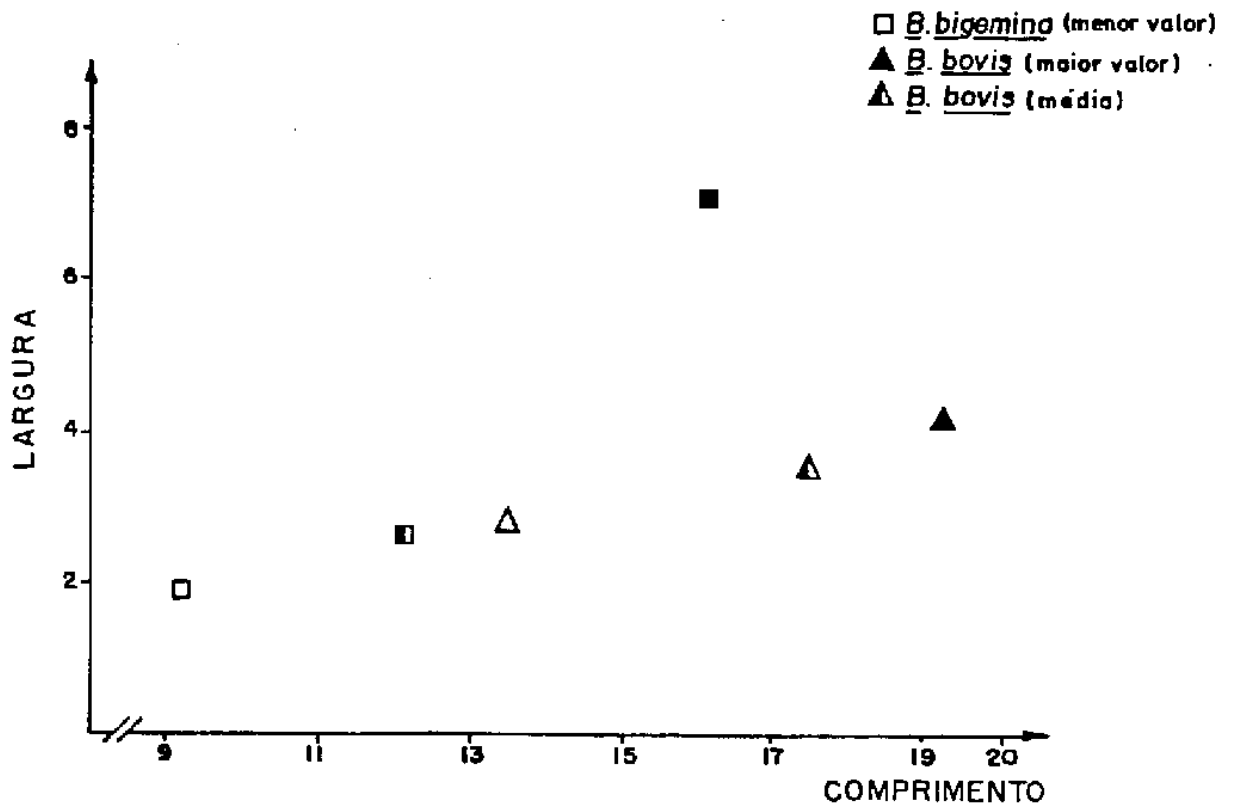


FIGURA 14. Relação entre comprimento e largura de esporozoítas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* indicando-se os valores paramétricos e as médias obtidas sobre 100 esporozoítas de cada espécie.

4.2.2.b. Infecção das teleóginas

Do total de 100 teleóginas examinadas após desprenderem-se naturalmente do bezerro número 359, 84 fêmeas apresentavam-se infectadas por *B. bigemina* e *B. bovis*, sendo que 46,4% no terceiro dia, 39,2% no quarto dia e 14% no quinto dia de incubação (Fig. 15). A frequência acumulada de 94% das teleóginas infectadas, alcançada no quinto dia, permaneceu até o 17º dia de incubação. Algumas teleóginas coletadas do mesmo hospedeiro com o mesmo grau de parasitemia (1,3% para *B. bigemina* e 0,4% para *B. bovis*) utilizadas para obtenção das amostras de ovos, permaneceram infectadas até o 21º dia de incubação, porém com um número reduzido de esporozoítas na hemolinfa.

A intensidade da infecção das teleóginas foi avaliada estabelecendo-se diferentes graus de infecção (grau 1, 2, 3 e 4) durante o período de 17 dias de incubação (Fig. 16). O grau 1 (1 a 5 esporozoítas por esfregaço) foi observado inicialmente no terceiro dia, permanecendo até o sétimo dia de incubação. O pico máximo foi registrado no quarto dia (Fig. 17), onde 85,71% das teleóginas apresentavam-se infectadas. O grau 2 foi calculado através das amostras examinadas entre o quinto e o 13º dia de incubação. Nestas amostras o pico máximo foi obtido no sexto dia, quando 91,66% das teleóginas apresentavam-se com seis a 50 esporozoítas por esfregaço. O início do grau 3 ocorreu no sexto dia, persistindo até o 17º dia. O pico máximo foi observado no 11º dia, em 98,8% das teleóginas, embora as amostras examinadas en-

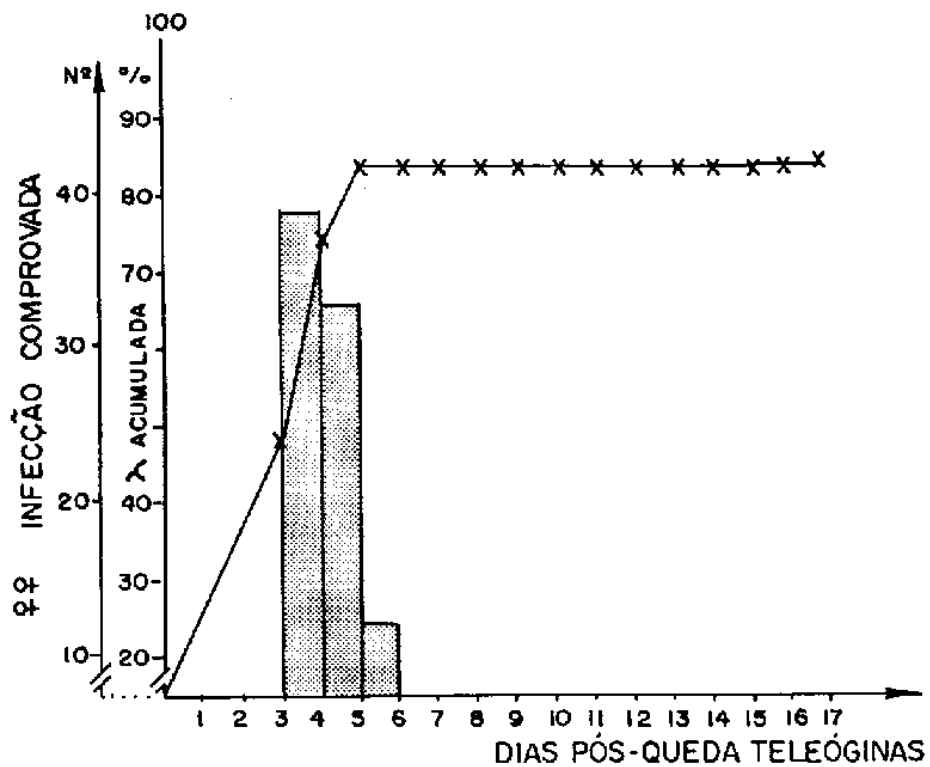


FIGURA 15. Número e frequência acumulada de 100 teleóginas de *Boophilus microplus* com infecção comprovada por *Babesia bigemina* no período de 0 a 17 dias pós-queda, alimentadas em bovino experimentalmente infectado.

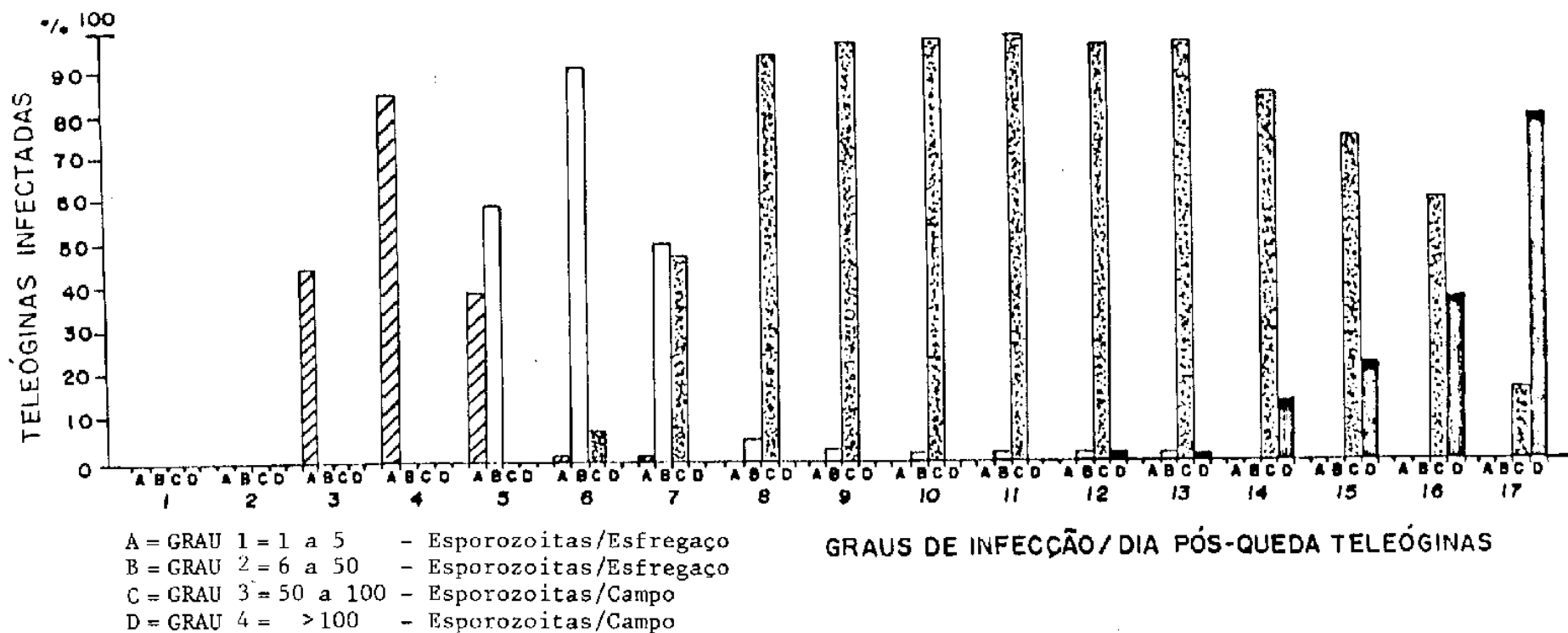


FIGURA 16. Percentual sobre 100 teleóginas de *Boophilus microplus* alimentadas em bovino experimentalmente infectado com *Babesia* spp., indicando-se os graus de infecção obtidos no período de 0 a 17 dias pós-queda das teleóginas.

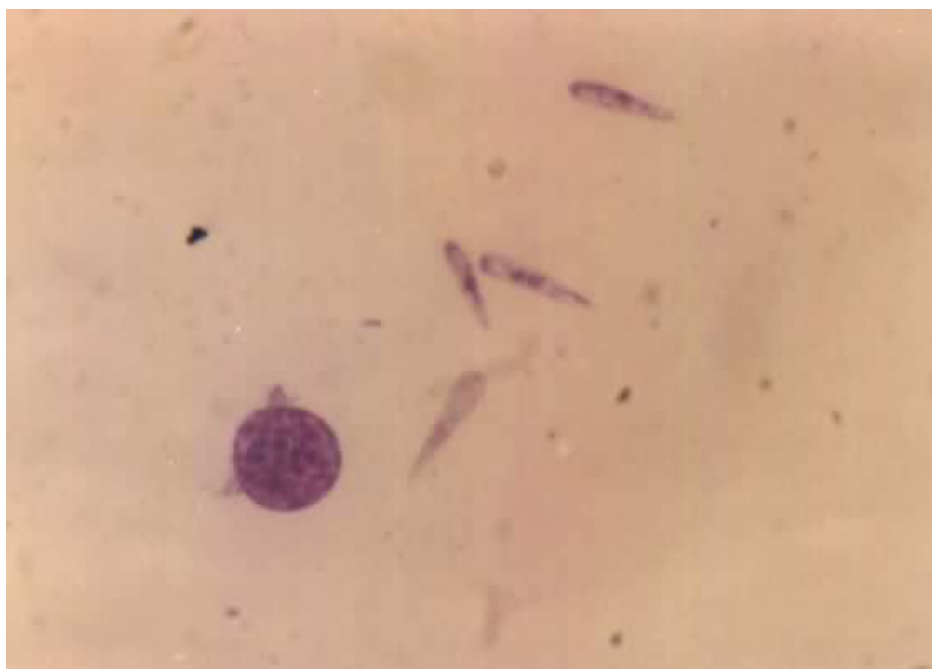


FIGURA 17. Esporozoitas de *Babesia* spp. com diferentes estágios evolutivos em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com quatro dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa, (Oc. 10X. Obj. 100X).

tre o oitavo e o 13° dia tenham evidenciado valores consideráveis de teleóginas com este grau de infecção. O grau 4 registrado a partir do 12° dia terminando no 17° dia com o pico máximo envolvendo 79,76% de fêmeas infectadas.

Nas teleóginas infectadas por *B. bovis*, apenas o grau 1 e 2 foram observados durante o período de colheita das amostras. Também foi observado uma frequência reduzida no número de fêmeas com seis a 50 esporozoítas por esfregaço de hemolinfa grau 4.

Nos resultados obtidos durante esta fase experimental (17 dias de incubação), verificou-se uma grande probabilidade em detectar a presença de esporozoítas de *B. bigemina* e *B. bovis* nas amostras coletadas durante o quinto dia de incubação, período este em que 84 teleóginas (100%) estavam positivas. Entretanto, a probabilidade em diagnosticar a infecção das teleóginas aumentou acentuadamente ao utilizar para exame amostras de hemolinfa coletadas entre o sexto e o 17° dia de incubação (Fig. 18). Estas observações vem reforçar a teoria sobre o efeito do período de incubação no grau de infecção das teleóginas. Tais resultados divergem das observações obtidas por MAHONEY & MIRRE (1971), que consideraram o quinto, sexto e sétimo dia de incubação como um período de baixa probabilidade para o diagnóstico dos esporozoítas de *B. bigemina* e *B. bovis* nas teleóginas de *B. microplus*. Entretanto, são semelhantes aos dados registrados por AKINBOADE & DIPEOLU (1981), que descreveram a presença de esporozoítas de *B. bovis* duran-

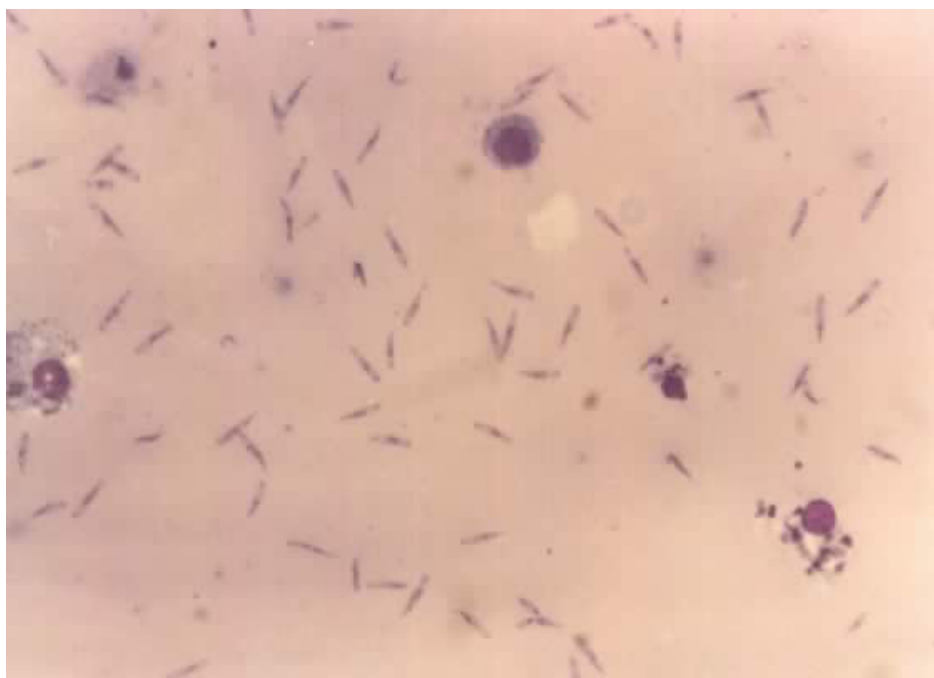


FIGURA 18. Esporozoitas de *Babesia bigemina* e *B. bovis* em hemolinfa de teleóquina de *Boophilus microplus* com sete dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 40X).

te o quinto e o 14° dia de incubação das teleóginas de *B. gai-gyi*, e consideraram o oitavo dia ideal para o diagnóstico dos esporozoítas nas amostras de hemolinfa. Em situações idênticas, GUGLIELMONE et al. (1985) descreveram presença de esporozoítas de *B. bigemina* e *B. bovis* em teleóginas de *B. microplus* durante o quarto e o 10° dia de incubação, e consideraram o nono e o 10° como ideal para diagnosticar a infecção das teleóginas coletadas do hospedeiro vertebrado com uma baixa parasitemia (1,5% para *B. bigemina* e *B. bovis*), e o sexto dia para as fêmeas coletadas de hospedeiros com parasitemia moderada (3,5% para *B. bigemina* e 1,5% para *B. bovis*). Estes autores reportando o trabalho de MAHONEY & MIRRE (1971) consideraram que, a falha no diagnóstico da infecção das teleóginas se deve a colheita e exame das amostras de hemolinfa até o sétimo dia de incubação.

4.2.3. Ovário

Nos exames realizados dos macerados de ovários, apenas as amostras coletadas de teleóginas a partir do quarto dia de incubação apresentavam-se infectadas 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, corado intensamente de vermelho, geralmente localizado na região mediana. O citoplasma corado de azul cla-

ro distribuía-se uniformemente em todo o parasito, embora em alguns esporozoítas tenha sido constatado a presença, de alguns vacúolos que variavam em número e tamanho. Uma massa de cromatina foi observada frequentemente na extremidade anterior (Fig. 19). A presença das formas vermiculares em amostras de ovário foram também observadas por KOCH (1906) em teleóginas de *B. australis*, *R. evertsi* e *H. aegyptium*, por REGENDANZ (1936) e RIEK (1964, 1966) em *B. microplus*, por MURATOV & KHEISIN (1959) em *B. calcaratus*.

Os esporozoítas encontrados nas amostras de ovário coletadas entre o sétimo e nono dia de incubação apresentavam-se com formas vermiculares, com a extremidade anterior ligeiramente dilatada; o citoplasma corado de azul claro continha vários vacúolos em toda sua extensão, e um núcleo corado na região mediana. O ponto de cromatina raramente foi observado, no entanto, quando presente, apresentou-se menor que o observado nas formas de início de incubação. As variações morfológicas observadas nos esporozoítas tornavam-se mais acentuadas com o aumento do período de incubação das teleóginas.

Nestas amostras verificou-se também, parasitos morfológicamente semelhantes aos esporozoítas descritos no início da incubação. Estas formas foram encontradas livres no meio, porém um grande número foi observado no interior das células do ovário.

Os raros esporozoítas de *B. bovis* encontrados durante este período, possuíam formas vermiculares com extremidade ante-



FIGURA 19. Esporozoitas de *Babesia* spp. em ovário de teleó-
gina de *Boophilus microplus* com sete dias de in-
cubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc.
10X. Obj. 100X).

rior romba, a posterior afilada e fortemente recurvada, semelhante ao observado em amostras de hemolinfa. O citoplasma corado de azul claro continha um grande vacúolo localizado anteriormente ao núcleo. Alguns parasitos apresentavam dois grandes vacúolos separados por um núcleo central corado de vermelho escuro. O ponto de cromatina, quando presente apresentava-se reduzido de tamanho e corado de vermelho claro. Estas observações estão de acordo com as obtidas por RIEK (1964, 1966).

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

Nas mensurações realizadas dos parasitos encontrados em todas as amostras, os merozoítas de *B. bigemina* mediam de 10,55 - 13,0 um de comprimento e 2,90 - 3,60 um de largura, os de *B. bovis* 14,25 - 15,80 um de comprimento e 3,0 - 3,9 um de largura, e as formas arredondadas, 2,05 - 4,35 um de diâmetro.

4.2.4. Tubos de Malpighi

Um pequeno número de esporozoítas foram encontrados nas amostras dos tubos de malpighi coletados durante todo o período experimental (período entre o primeiro e o 10° dia de incubação) (Fig. 20). Neste período, os primeiros merozoítas fo-



FIGURA 20. Esporozoitas de *Babesia* spp. em túbulos de malpighi de teleógina de *Boophilus microplus* com cinco dias de incubação. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

ram encontrados no quarto e quinto dia de incubação. RIEK (1964, 1966) também descreveu inicialmente a presença destes parasitos nos tubos de malpighi a partir do quarto dia de incubação, porém com maior frequência a partir do quinto dia. Estas formas são vermiculares, com um núcleo central corado de vermelho escuro; o citoplasma corado de azul claro contendo vários vacúolos. O ponto de cromatina raramente foi observado. Todas as formas apresentavam a extremidade anterior arredondada e a posterior afilada e retilínea.

As formas utilizadas para os estudos morfométricos apresentavam valores de 9,6 - 13,80 um de comprimento e 3,55 - 3,65 um de largura.

Neste experimento não foi observado a multiplicação dos parasitos no interior do citoplasma celular como o registrado por RIEK (1964).

4.2.5. Ovos

Das 84 teleóginas comprovadamente infectadas por *B. bigemina* e *B. bovis*, 100% das amostras de ovos estavam infectadas, sendo 46,42% no quarto dia, 34,52% no quinto, 16,66% no sexto e 2,38% no sétimo dia pós-queda. A frequência acumulada de 100% das amostras de ovos infectados foi evidenciada inicialmente no sétimo dia, permanecendo constante até o 17º dia pós-queda das teleóginas (Fig. 21).

A presença dos merozoítas em amostras de ovos coletados

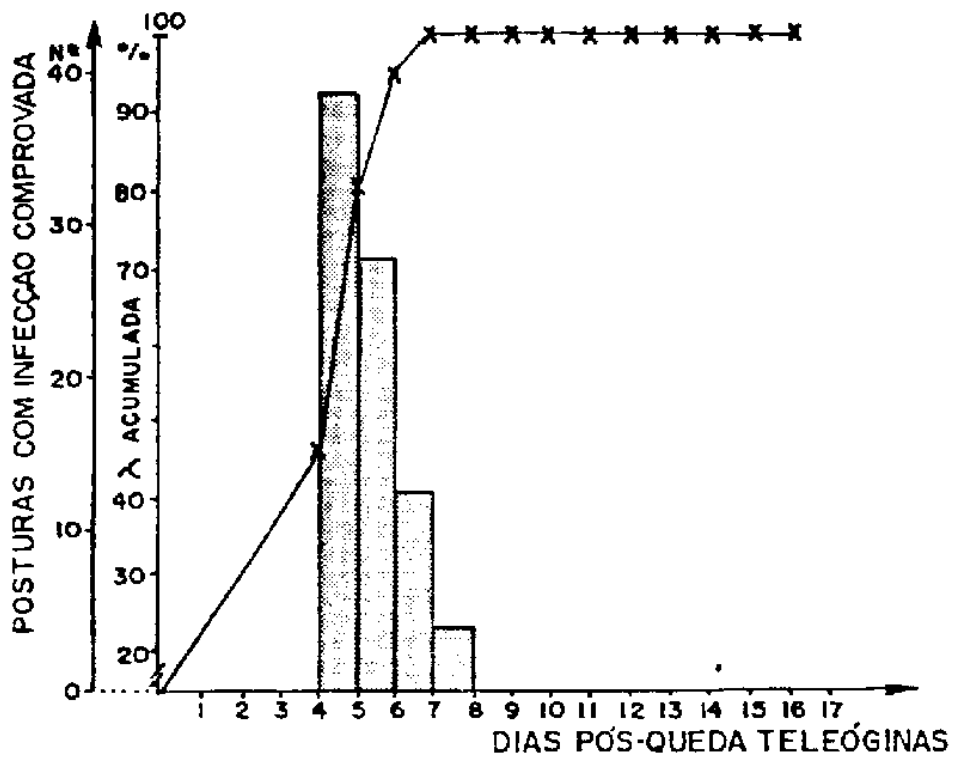


FIGURA 21. Número e frequência acumulada de postura de 100 teleóginas de *Boophilus microplus* com infecção comprovada por *Babesia* spp. no período de 0 a 17 dias pós-queda, alimentadas em bovino experimentalmente infectado.

de teleóginas experimentalmente infectadas, também foram observadas por CRAWLEY (1915), TOSEMBUSCH (1927), DENNIS (1932), REGENDAZ (1936), MURATOV & KHEISIN (1959), PETROV (1941), RIEK (1964, 1966), EL-ALLAWY (1977), AKINBOADE & DIPEOLU (1981) e EL-ALLAWY (1983).

O aparecimento inicial destas formas ocorreu nas amostras coletadas de teleóginas com quatro e cinco dias após a queda natural do hospedeiro. Resultados semelhantes foram encontrados por RIEK (1964, 1966), AKIMBOADE & DIPEOLU (1981) e EL-ALLAWY (1983).

Durante os exames das amostras, verificou-se que os ovos de *B. microplus* com dois dias de incubação já apresentavam merozoítas de *Babesia* (Fig. 22). Um reduzido número de parasitos nos macerados confeccionados entre o quarto e o sétimo dia foi comprovado, em seguida evidenciou-se aumento progressivo até o 17º pós-queda das teleóginas (Fig. 23). Estas observações permitiram caracterizar o efeito da incubação na infectividade dos ovos, bem como propor a colheita e exame das amostras a partir do sétimo dia de incubação, aumentando assim a probabilidade do diagnóstico das infecções por *B. bigemina* e *B. bovis*.

Nas amostras de ovos utilizados para o estudo do comportamento evolutivo dos esporozoítas de *B. bigemina* e *B. bovis* em diferentes tempos de incubação, verificou-se que, as formas nos primeiros dias de incubação eram vermiculares com um núcleo corado de vermelho escuro, localizado na região me-

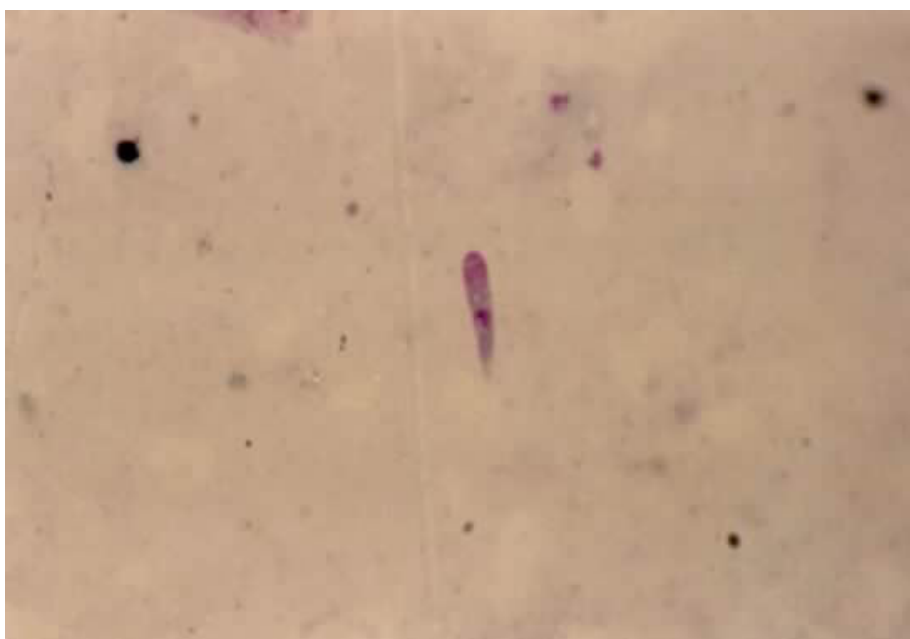


FIGURA 22. Esporozoitas de *Babesia* spp. em ovos de teleóginas de *Boophilus microplus* com dois dias de incubação. Macerado de ovos corado pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

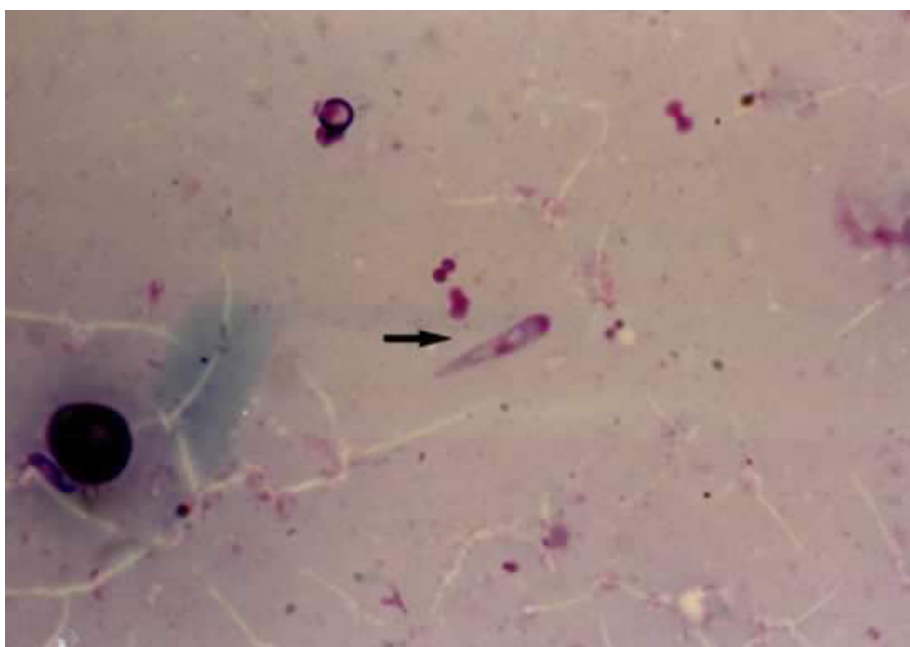


FIGURA 23. Esporozoitias de *Babesia* spp. em ovos de teleó-
gina de *Boophilus microplus* com oito dias de
incubação. Coloração pelo método de Giemsa.
(Oc. 10X. Obj. 100X).

diana ou ligeiramente deslocado para a extremidade posterior. O citoplasma azul claro continha pequenos vacúolos, e o ponto de cromatina corado de vermelho escuro localizando-se na extremidade anterior do parasito. A extremidade anterior era arredondada e a posterior afilada e retilínea. Estas formas são semelhantes aos encontrados em amostras de hemolinfa, tubos de malpighi e ovários.

Os esporozoítas observados nas amostras coletadas no final do período de incubação apresentavam algumas variações morfológicas quando comparadas com as formas descritas inicialmente. O núcleo central apresentava-se menos compacto e corado de vermelho claro; o citoplasma corado de azul claro evidenciou grandes vacúolos. O ponto de cromatina situado na extremidade anterior, raramente foi observado.

As mensurações dos merozoítas encontrados nas amostras de início e final de incubação mediram de 12,25 - 13,75 um de comprimento por 3,0 - 3,2 um de largura, e 20,45 - 24,50 um de comprimento por 3,55 - 3,70 um de largura, respectivamente. Entretanto, o período de postura não interferiu na morfometria do parasito.

4.2.6. Larva não alimentada

Nas amostras coletadas, verificou-se a presença de formas vermiculares, livres no meio e no interior do citoplasma das células intestinais. Estas formas apresentavam um nú-

cleo central corado de vermelho escuro e o citoplasma bem distribuído corado de azul claro; o ponto de cromatina corado de vermelho escuro localizado na extremidade anterior, embora em alguns espécimes esta estrutura não tenha sido encontrada (Fig. 24).

Células intestinais contendo infecção múltipla foram também observadas nas amostras de larvas não alimentadas. No citoplasma destas células foram encontradas formas vermiculares, arredondadas e ovais. As formas arredondadas e ovais apresentavam um grande núcleo central corado de vermelho escuro, e o citoplasma azul claro, distribuído uniformemente. Os parasitos vermiculares apresentavam as mesmas características morfológicas descritas anteriormente. O aparecimento destas formas foi o resultado da multiplicação dos parasitos no interior da célula hospedeira (Fig. 25). As formas vermiculares ao penetrarem no citoplasma, apresentavam a massa de cromatina mais difusa e distribuída na periferia do parasito. Posteriormente, a cromatina dividiu-se em vários pontos arredondados envolvido por citoplasma, as quais adquiriram formas arredondadas e ovais, e por último, formas vermiculares. As formas vermiculares ora descritas, apresentavam-se bem semelhante as encontradas em amostras de hemolinfa, tubos de malpighi e ovos de início de incubação. Observações semelhantes foram realizadas por RIEK (1964, 1966).

As medidas encontradas para as formas vermiculares intra e extracelulares variavam de 14,15 - 21,75 um de compri-

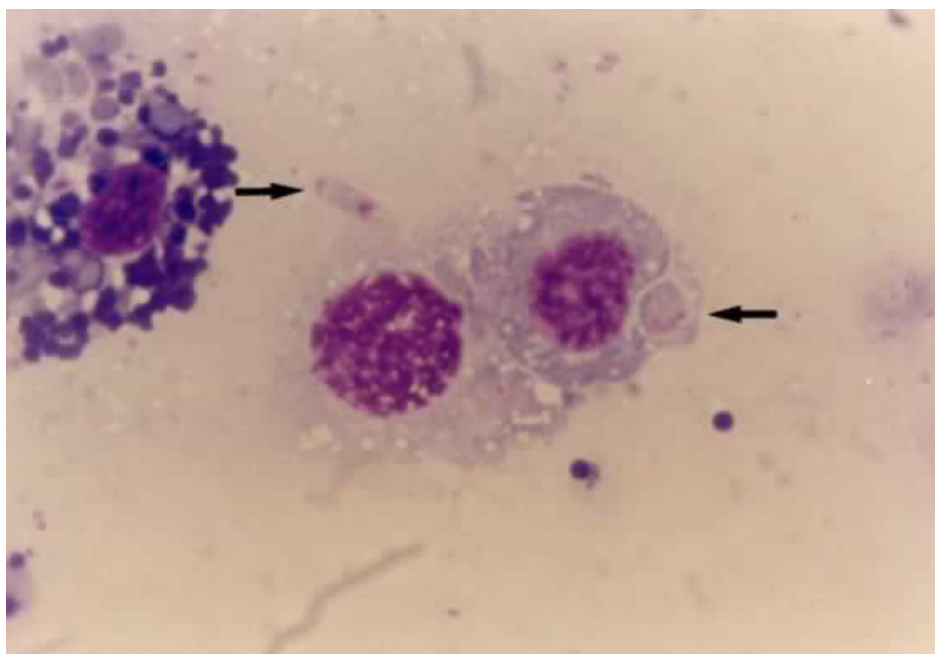


FIGURA 24. Desenvolvimento inicial de *Babesia* spp. em citoplasma de células epiteliais do intestino de larvas de *Boophilus microplus* com dois dias pós-eclosão, evidenciando também forma vermicular (esporozoita) extra celular. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

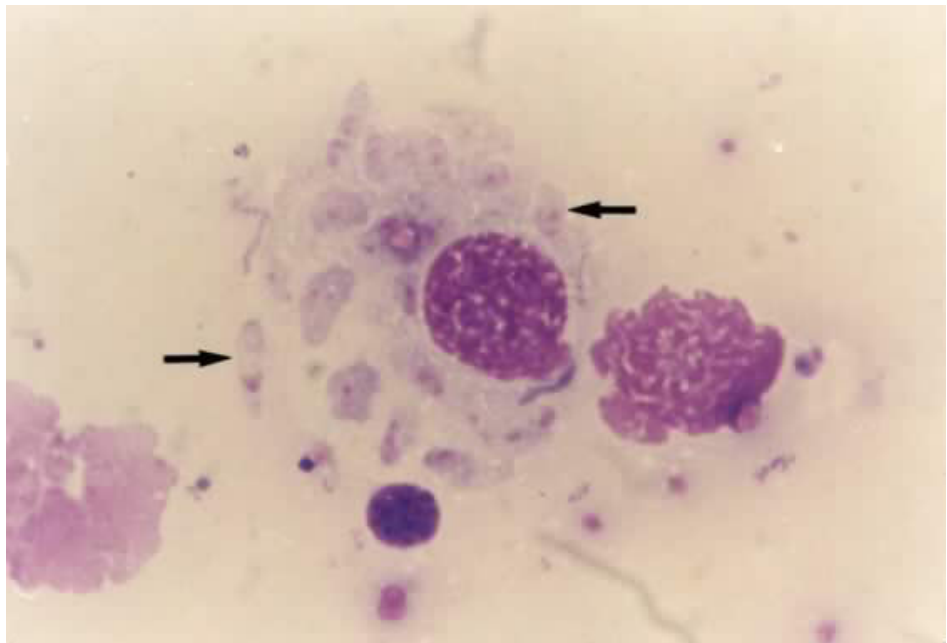


FIGURA 25. Desenvolvimento de *Babesia* spp. em citoplasma de células epiteliais do intestino de larvas de *Boophilus microplus* com três dias pós-eclosão. Coloração pelo método de Giemsa. (Oc. 10X. Obj. 100X).

mento e 3,1 - 3,7 m de largura; para as arredondadas foram de 11,0 - 13,2 m de diâmetro e para as ovais 14,35 - 16,30 m de comprimento e 4,30 - 4,75 m de largura.

4.3. Efeitos da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* no vetor *B. microplus*

Os valores paramétricos encontrados no peso das teleóginas de *B. microplus* infectadas por *B. bigemina* e *B. bovis* foram de 240,0 e 480,0 mg com média de 350,61 mg (Fig. 26). Estes dados foram superiores aos encontrados no grupo das teleóginas não infectadas cujo o menor e o maior valor registrado foi de 180,0 e 380,0 mg e a média de 278,42 mg (Fig. 27). Estes dados não estão de acordo com os achados de DAVEY (1981) que ao estudar o efeito da infecção por *B. bovis* sobre o vetor *B. microplus* não considerou como significativo a diferença observada entre o peso das teleóginas infectadas (395,6 mg) e não infectadas (409,3 mg).

O período de pré-postura observado para as teleóginas infectadas e não infectadas foi de 3,0 e 3,2 dias, respectivamente. Portanto não apresentando diferença significativa. Estes resultados caracterizaram a não interferência destes parasitos durante esta fase evolutiva. O período de postura observado para o grupo infectado foi de 20,1 dias, não apresentando diferença significativa quando comparado com o valor obtido para o grupo não infectado, o qual apresentou um período médio

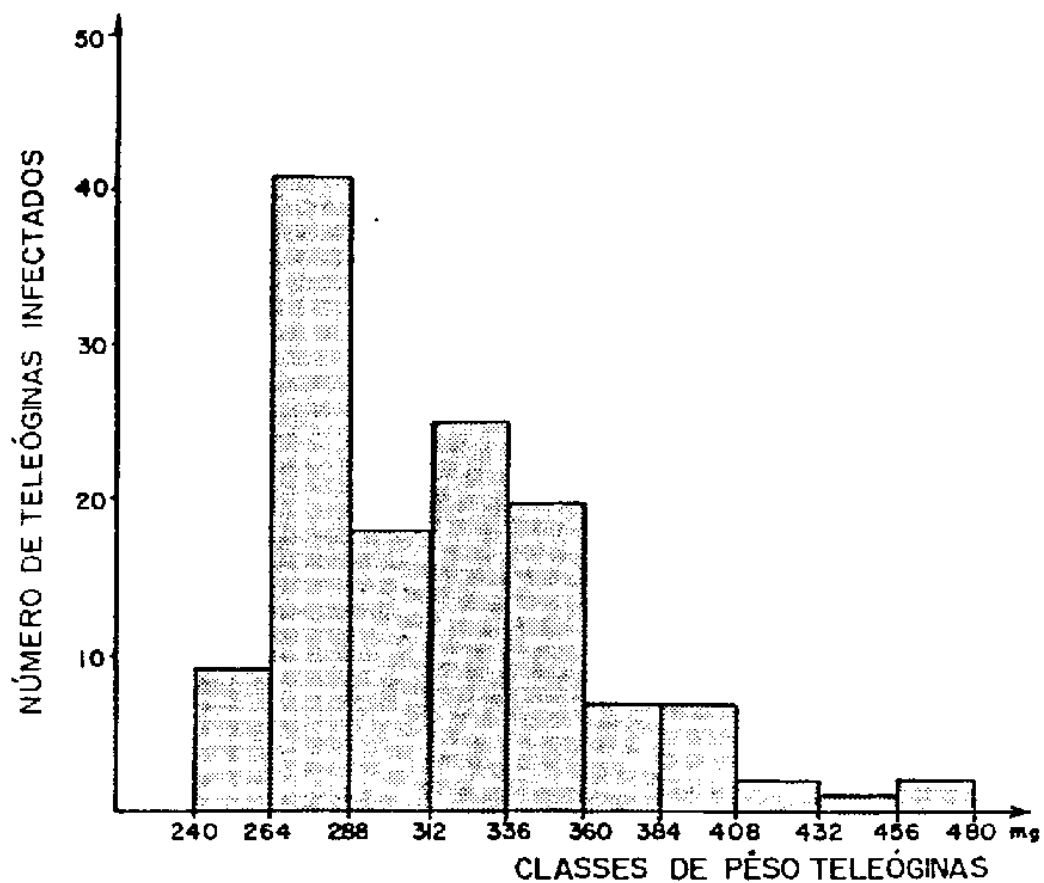


FIGURA 26. Número de teleóginas de *Boophilus microplus*, infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de peso entre 240 e 480 mg.

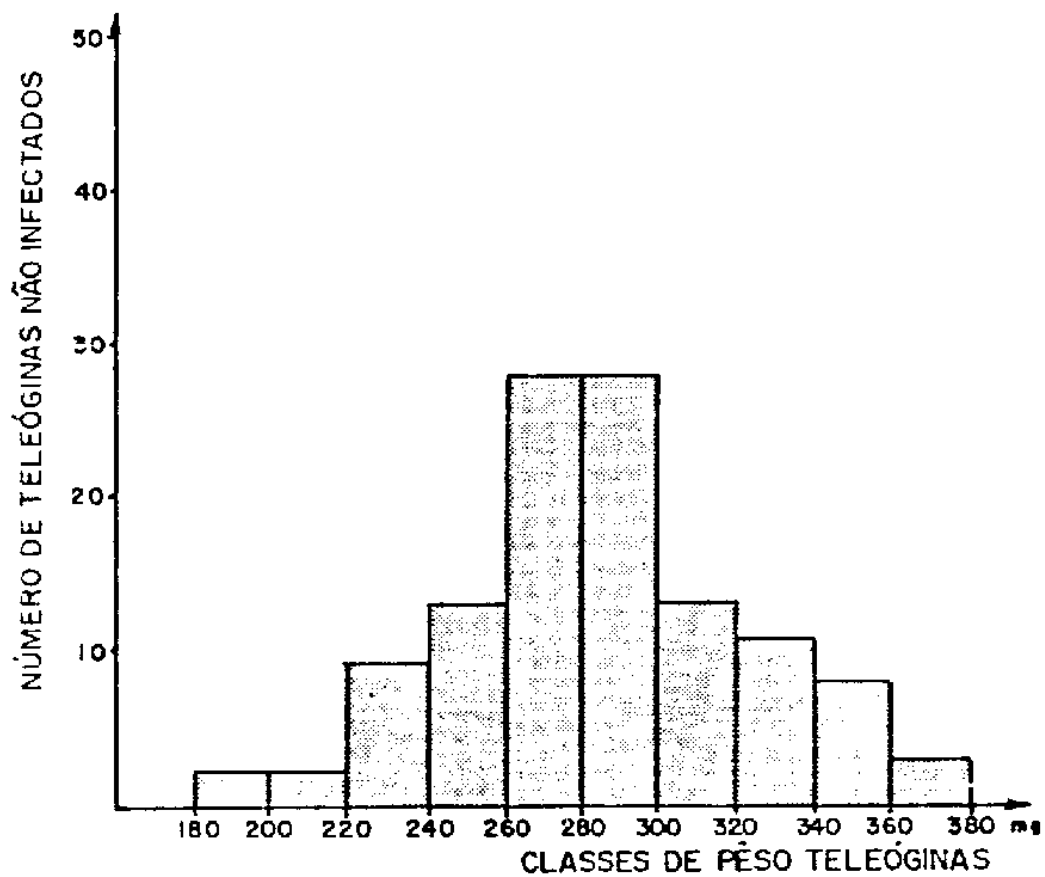


FIGURA 27. Número de teleóginas de *Boophilus microplus* não infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de peso entre 180 e 380 mg.

de 20,2 dias.

Nas fêmeas infectadas, os valores encontrados para o peso das posturas variaram entre 5,36 e 21,45 mg com média de 14,01 mg (Fig. 28), evidenciando uma diferença significativa quando comparados com os valores paramétricos de 8,01 e 20 mg e média de 14,87 mg registrados para as posturas coletadas do grupo de teleóginas não infectadas (Fig. 29). Estes dados sugeriram a interferência da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* na produção de ovos. A redução na massa de ovos das teleóginas de *B. microplus* infectadas com *B. bovis* foi observada por DAVEY (1981). GRAY (1982) também, caracterizou o efeito de *B. bigemina* na capacidade de postura das teleóginas de *B. decoloratus*.

O tempo médio de incubação para os ovos originados do grupo de teleóginas infectadas foi de 26,4 dias e para os de teleóginas não infectadas de 26,7 dias, o que deixa claro a não interferência de *B. bigemina* e *B. bovis* nesta fase do ciclo biológico do carrapato *B. microplus*. Estas observações reforçaram os resultados obtidos por DAVEY (1981). A taxa de eclosão dos ovos em experimento foi de 90%, tanto para o grupo infectado quanto para o não infectado.

4.4. Taxa de infecção das teleóginas

Das 100 teleóginas de *B. microplus* coletadas por despreendimento natural do bezerro número 362 durante o período em que a parasitemia por *B. bigemina* era de 1,5% e por *B. bo-*

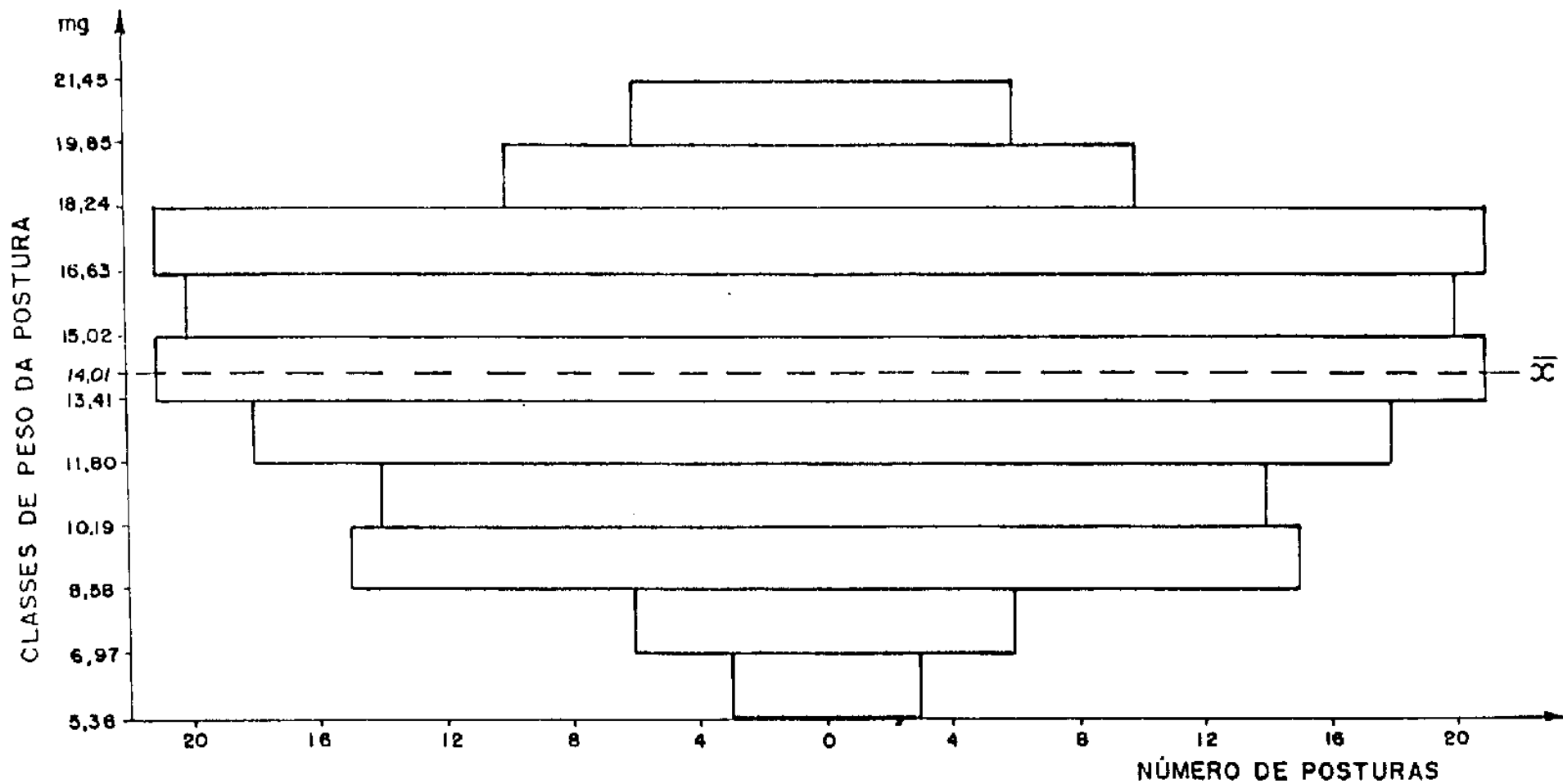


FIGURA 28. Número de posturas de *Boophilus microplus* infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de pesos de posturas entre 5,36 e 21,45 mg com indicação da média.

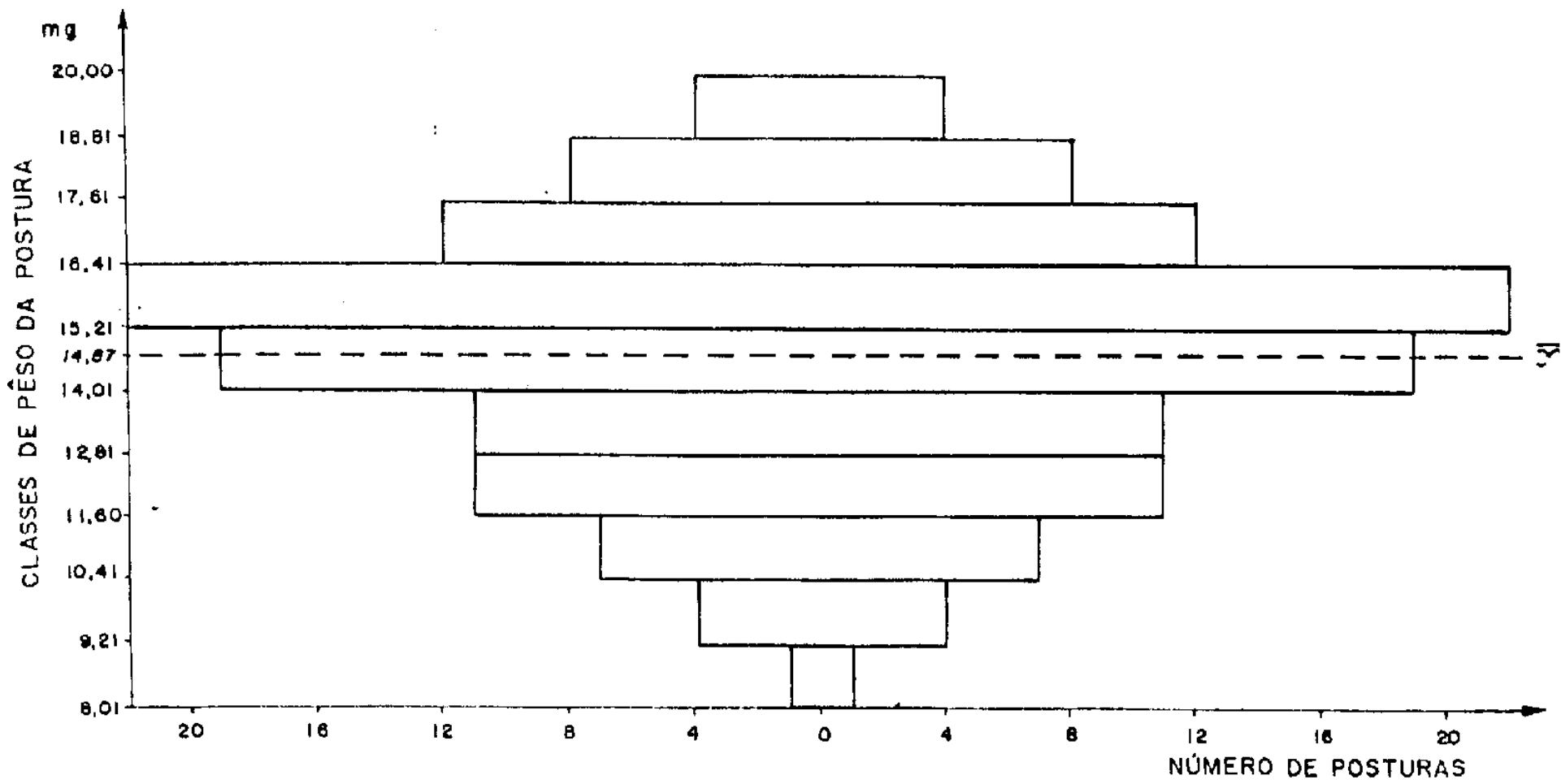


FIGURA 29. Número de posturas de *Boophilus microplus* não infectadas por *Babesia* spp. separadas em 10 classes de pesos de posturas entre 8,01 e 20,00 mg com indicação da média.

vis de 0,4% 96% apresentavam-se infectadas aos exames de hemolinfa realizados após o quinto dia de incubação. Das teleóginas infectadas, 91 apresentavam-se com a coloração anormal, entre o marrom escuro e o preto. Neste grupo observou-se que 23 teleóginas não realizaram postura, 30 apenas iniciaram e 38 realizaram parcialmente a postura. Apenas cinco teleóginas infectadas apresentavam-se com coloração normal e realizaram totalmente a postura. A morte de 94,79% das teleóginas infectadas foi observada entre o sétimo e o 12º dia de incubação.

Das 100 teleóginas de *B. microplus* coletadas do bezerro número 359 quando a parasitemia por *B. bigemina* e *B. bovis* foi de 1,3% e 0,4%, respectivamente, 88% estavam infectadas após o quinto dia de incubação. Da amostra infectada, 34 teleóginas não realizaram postura, 32 apenas iniciaram a postura e 22 realizaram parcialmente a postura. Deste grupo, 75% das teleóginas (66 teleóginas), tinham uma coloração entre o marrom escuro e o preto, semelhante ao observado nas amostras coletadas do bezerro número 362. A taxa de mortalidade registrada nas teleóginas infectadas foi de 75%. Este valor foi observado entre o sétimo e o 10º dia de incubação, e corresponde as teleóginas que apresentaram uma coloração marrom escuro ou preta.

A taxa de infecção observada nos grupos de teleóginas, coletadas em hospedeiros com diferentes graus de parasitemia, foi semelhante ao encontrado por RIEK (1964, 1966). Mediante estas observações, concluiu-se que, a infecção das teleóginas não depende especificamente do grau de parasitemia do

hospedeiro vertebrado.

A redução do período de postura e por conseguinte da massa de ovos registrados nas teleóginas infectadas, estavam associadas a intensa multiplicação dos parasitos na hemolinfa, e principalmente no ovário. Resultado semelhante foi encontrado por MUANGYAI (1974).

A taxa de mortalidade observada nos grupos de teleóginas ingurgitadas em hospedeiros com diferentes graus de parasitemia variou de 88 a 94,79%. Estes dados concordam com os achados de GRAY (1982), o qual registrou uma taxa de mortalidade de 93 a 100% em grupos de teleóginas coletadas de bovinos com parasitemia de 0,02 e 0,07% para *B. bigemina*. RIEK (1964), também registrou uma taxa de mortalidade de 90%, embora, tenha trabalhado com teleóginas coletadas de bovinos com parasitemia superior a 20%. Taxa de mortalidade de 70% foi encontrada por DAGLIESH et al. (1981) em teleóginas infectadas por *B. bovis* e GUGLIELMONE et al. (1985) em teleóginas com infecção por *B. bigemina* e *B. bovis*.

Durante o período de incubação em que foi observado a maior taxa de mortalidade nas teleóginas infectadas, estando em concordância com os resultados encontrados por RIEK (1964), ANTHONY (1970), DALGLIESH et al. (1981), GRAY (1982) e GUGLIELMONE (1985). No entanto, RIEK (1966) registrou entre o quinto e sétimo dia de incubação uma acentuada taxa de mortalidade de teleóginas de *B. microplus* infectadas com *B. bovis*.

As amostras de hemolinfa coletadas das teleóginas com

acentuado grau de infecção apresentavam-se com coloração vermelho escuro. Esta alteração foi considerada como resultado da presença de hemoglobina na hemolinfa. Este fenômeno parece estar diretamente ligado a multiplicação dos parasitos no interior das células, e como consequência a alteração da permeabilidade da parede intestinal. Estas observações estão de acordo com os dados de RIEK (1964) e DALGLIESH et al. (1981).

Nos resultados obtidos, verificou-se grandes evidências de que a morte das teleóginas infectadas sobrevem a multiplicação do parasito nos hemócitos, e nas células epiteliais da parede intestinal, fazendo com que estas células perdessem suas funções vitais.

5. CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos e discutidos pode-se concluir que:

- O ciclo evolutivo de *B. bigemina* e *B. bovis* foi observado em tubo digestivo, hemolínfa, tubos de malpighi, ovário e ovos de teleóginas e em células da parede intestinal de larvas não alimentadas, precedido de um estágio vermicular (estágio móvel).

- A presença de formas raiadas e oocinetos de *Babesia* spp. na luz intestinal de teleóginas de *B. microplus*, indicam a existência de reprodução sexuada no hospedeiro invertebrado.

- A infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* determinam uma taxa de mortalidade das teleóginas de *B. microplus* entre o sétimo e o 12º dia de incubação ou provoca uma redução no ingurgitamento e peso da massa de ovos.

- O período ideal para o diagnóstico das infecções por *B. bigemina* e *B. bovis* em teleóginas de *B. microplus* cor-

responde ao oitavo e o 13º dia após desprenderem-se naturalmente do hospedeiro vertebrado, independente do grau de parasitemia do hospedeiro vertebrado.

- Os dados morfométricos podem ser utilizados como principais critérios para o diagnóstico diferencial entre os esporozoítas de *B. bigemina* e *B. bovis* durante o desenvolvimento em hemolinfa de teleóginas com o mesmo período de incubação.

- Não há interferência direta do grau de parasitemia do hospedeiro vertebrado sobre o ciclo de *B. bigemina* e *B. bovis* no vetor *B. microplus*.

- Os animais utilizados no experimento procedente do Planalto do Itatiaia, zona fisiográfica de Resende, localizada acima de 2.400 m de altitude foram comprovadamente negativos para *B. bigemina* e *B. bovis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHUTHAN, H.N.; MAHADEVAN, S. & LALITHA, C.M. Studies on the development forms of *Babesia bigemina* and *Babesia canis* in ixodid ticks. *Indian Vet.* 5: 181-184. 1980.
- AGBEDE, R.I.S.; KEMP, D.H. & HOYTE, H.M.D. *Babesia bovis* infection of secretory cells in the gut of the vector tick *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.* 16: 109-114. 1986.
- AKINBOADE, O.A. & DIPEOLU, O.O. Detection of *Babesia bovis* infections in *Boophilus geigyi* with egg crushings larval smears, and haemolymph puncture. *Vet. Q.* 3: 143-147. 1981.
- ANTHONY, D.W.; JOHNSON, A.J. & HOLBROOK, A.A. Some effects of parasitism by *Babesia caballi* on the tropical horse tick. *Dermacentor (= Anocentor) hirtens*. *J. Invert. Pathol.* 15: 113-117. 1970.
- BARTH, R. A fauna do parque nacional do Itatiaia. *Bol.* 6. Parque Nacional de Itatiaia, M.A. 149 p. 1957.
- BURGDORFER, W. A technique for detection of rickettsiae in tick. *Am. J. Trop. Hyg.* 19: 1010-1014. 1970.

- CRAWLEY, H. Stage of *Piroplasmae bigemina* and *Margaropus annulatus*. J. Parasitol. 2: 87-92. 1915.
- DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P. & DUNCALFE, F. Reducion in pathogenicity of *Babesia bovis* for its tick vector *Boophilus microplus* after rapid blood passage in splenectomized calves. Z. Parasitenkd. 64: 347-351. 1981.
- DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P. & RODWELL, B.J. Increased numbers of strahlenkorper in *Boophilus microplus* ticks ingesting a blood passage strain of *Babesia bigemina*. Rev. Ver. Sci. 31: 350-352. 1981.
- DAVEY, R.B. Effects of *Babesia bovis* on the ovipositional success of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. Ann. Entomol. Soc. Am. 74: 331-333. 1981.
- DENNIS, E.W. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne) of texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus* (Say). Univ. Calif. Publ. Zool. 36: 263-298. 1932.
- EL ALLAWY, T.A. Detection of piroplasmae in the tick vector haemolymph and eggs smears of tick with especial reference to the effect of incubation time on the infectivity of tick eggs. Agric. Res. Rev. 55: 9-13. 1977.
- EL ALLAWY, T.A. A study on the infection rate of *Boophilus annulatus* tick egg infected with *Babesia bigemina*. Assint. Vet. Med. J. 10: 149-155. 1983.
- FAJARDO, F. A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. Rev. Med. S. Paulo. 4: 315-319. 1901.
- FRIEDHOFF, K.T. & BUSCHER, G. Rediscovery of koch's strahlen-

- korper of *Babesia bigemina*. Z. Parasitenk. 50: 345-347. 1976.
- FRIEDHOFF, K.T. & SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* of ticks. p. 267-327. In: RISTIC, M. & KREIER, J.P. (Ed.) Babesioses. Acad. Press. New York. p. 589. 1981.
- GUCLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J., BERMUDEZ, A.C. & HADANI, A. Detection de merozoitos grandes (vermiculos de *Babesia* em teleóginas de *Boophilus microplus*) alimentados sobre terneros com distintos niveles de parasitemia de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (= *Babesia argentina*). Rev. Iber. Parasitol. 46: 303-311. 1985.
- GRAY, J.S. The effects of the piroplasm *Babesia bigemina* on the survival and reproduction of the blue tick, *Boophilus decoloratus*. J. Invent. Pathol. 39: 413-415. 1982.
- HOYTE, H.M.D. The tick-fever parasites of cattle. Proc. R. Soc. Queesl. 87: 5-8. 1976.
- I.I.C.A. Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovinas. San José, Costa Rica. (IICA, série salud animal, Publication científica n° 8). 79 p. 1985.
- KOCH, R. Beitrag zur entwicklungsgerchichte der piroplasmen. Z. Hyg. Infekt. Kr. 54: 1-9. 1906.
- MAHONEY, D.F. & MIRRE, G.B. Bovine babesiasis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Caneistrini). Ann. Trop. Med. Parasitol. 65: 309-317. 1971.
- MAHONEY, D.F. & MIRRE, G.B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*

- na). Rev. Vet. Sci. 23: 37-103. 1977.
- MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. The piroplasms: Cycle and sexual stages. Adv. Parasitol. 23: 37-103. 1984.
- MORZARIA, S.P. & BROKLESBY, D.V. A differential diagnostic criterion for *Babesia major* and *Babesia bigemina* vermicules from tick haemolymph. Z. Parasitenk. 52: 241,243. 1977.
- MUANGYAI, M. Quantitative studies on transovarial infection of *Boophilus microplus* (Ixodoidea) with *Babesia bigemina* (Piroplasma) Inaugural Dissertation. Trerarzt. Hochschule. 38 p. 1974.
- MURATOV, E.A. & KHEISIN, E.M. The development of *Piroplasma bigeminum* in the tick *Boophilus microplus*. Zool. Zh. 38: 970-986. 1959.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the life-cycle on the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). Onderstepoort. J. Ver. Res. 38: 215-224. 1971.
- PETROV, V.G. Development of *Babesia bovis* in *Ixodes ricinus*, with a method for detection of carrier ticks. 3rd Soveshch. Parasit. Probl. 29-31. 1941.
- REGENDANZ, P. Uber den entwick lungsgang von *Babesia bigemina* in der zecke *Boophilus microplus*. Zbl. Bakt. 137: 423-428.1936.
- RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus*. Aust. J. Agric. Res. 15: 802-821. 1964.
- RIEK, R.F. The life of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Spo-

- rozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (canestrini). Aust. J. Agric. Res. 17: 247-254. 1966.
- ROSENBUSCH, F. Estudios sobre la tristeza; evolution del *Piroplasma bigemina* en la garrapata (*Boophilus microplus* Can.) Rev. Uniu. B. Aires. 5: 862-867. 1927.
- SMITH, T. & KILBORNE, F.I. Investigations in to the nature, and prevention of Texas or southern cattle fever. Bull. U.S. Bur. Anim. Ind. 1: 177. 1893.
- 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. J. Protozool. 25: 497,501. 1978.
- STEWART, N.P. & DALGLIESH, R.J. Life cycles of the cattle tick and tick fever parasites. Queens. Agric. 107: 305-308. 1981.
- 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 of *Boophilus microplus*. Res. Vet. Sci. 40: 94-98. 1986.
- THOMPSON, K.C. A technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina*, ver. Parasitol. 2: 223-229. 1976.
- WATTERNDORFF, S. Initial developmental stage of *Babesia bigemina* in the gut of female ticks (*Boophilus microplus*) Inaugural Dissertation. Inst. Parasit., Tierarzt. Hochschule. Hanover. 99 p. 1980.
- WEBER, G. & FRIEDHOFF, K.T. Preliminary observations on the ul-

trastucture of supposed secual stages of *Babesia bigemina*
(Piroplasma). Z. Parasitenk. 5: 83-92. 1977.