

TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DE *Babesia bovis* EM *Boophilus microplus*: OBTENÇÃO DE CEPA DE CARRAPATO LIVRE DE *Babesia* spp.

Babesia bovis TRANSOVARIAN TRANSMISSION IN *Boophilus microplus*: OBTENTION OF A *Babesia* FREE TICK STRAIN.

Tânia Regina Bettin dos Santos¹ João Carlos Gonzales²
Joceli Maria Chies³ Nara Amélia da Rosa Farias⁴

RESUMO

O presente trabalho objetivou o estudo de parte do ciclo da *Babesia bovis* no seu hospedeiro invertebrado, o carrapato *Boophilus microplus*. Analisou-se a capacidade de infecção e transmissão transovariana de *B. bovis* em partenóginas de *B. microplus*, alimentadas em bovinos portadores e enfermos por esse protozoário. No 18^o dia após a infestação, coletaram-se partenóginas diretamente do corpo dos bovinos e teleóginas após o desprendimento natural, a partir do 21^o dia. Todos os grupos foram incubados a 27°C e umidade relativa superior a 70%. No 5^o dia após o início da postura, realizou-se o exame de hemolinfa a fim de diagnosticar a infecção dos ínstares por *B. bovis*. A ausência de infecção detectada no exame de hemolinfa foi confirmada posteriormente com o teste biológico, revelando que partenóginas não transmitem *B. bovis* transovarianamente. Esses resultados oferecem uma técnica simplificada para a obtenção de cepas de carrapatos livres de *B. bovis*.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, *Babesia* spp., biologia, transmissão transovariana e cepa livre.

SUMMARY

In this experiment part of the life cycle of *Babesia bovis* in its invertebrate host, the tick *Boophilus microplus* was studied. In order to evaluate the capacity of infection and transmission of *B. bovis* were collected semi-engorged females of *B. microplus* fed on carrier and ill bovines. In the 18th day after infestation, semi-engorged females were collected directly from bovine bodies and after 21st day engorged females dropped on the

ground. All the collected groups were incubated at 27°C and relative humidity greater than 70%. At the 5th day of oviposition the diagnosis was made by direct examination of haemolymph smears. The biological test revealed that *B. bovis* transovarial transmission doesn't happen in semi-engorged females. The results offer a simple technique to obtain strains of ticks free of *B. bovis*.

Key words: *Boophilus microplus*, *Babesia* spp., biology, transovarian transmission and free strain.

INTRODUÇÃO

As parasitoses ainda hoje são responsáveis por inúmeros prejuízos na pecuária. Entre elas, o complexo carrapato/*Babesia* causa perdas como retardo no crescimento, desvalorização na comercialização entre zonas livres e endêmicas, queda na produção, entre outras. O desenvolvimento de *Babesia* spp. no hospedeiro invertebrado vem sendo estudado desde o início do século e ainda existem controvérsias entre autores, quanto ao período de infecção das fêmeas, à transmissão transovariana do protozoário e quanto à importância dos hospedeiros não habituais na epidemiologia do complexo carrapato/babesiose bovina (RIEK, 1964; RIEK, 1966; YOUNG & MORZARIA, 1986).

¹Médico Veterinário, MSc., Professor Assistente, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: nafarias@ufpel.tche.br. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário, Dr., Professor Adjunto, Setor de Entomozooses, Faculdade de Veterinária, Universidade federal do Rio grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS..

³Biólogo, MSc., Pesquisador do Centro de Biotecnologia, UFRGS.

⁴Médico Veterinário, Dr., Professor Adjunto, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPeL.

No estudo da infecção das teleóginas, CALLOW (1968), utilizando a técnica de transferência artificial de diferentes estádios de *B. microplus* de bovinos portadores de *B. bigemina* para bovinos livres e sensíveis a *Babesia spp.*, associado ao uso de babesicidas, concluiu que o carrapato somente se infecta com esse protozoário nas últimas 16 a 24 horas de repasto sanguíneo; porém, não são conhecidos os fatores que impedem a infecção anterior a esse período. Podem estar relacionados a uma digestão acelerada que destrói os protozoários (POLIANSKI & KHEISIN, 1959) ou a transformações das células basofílicas da parede intestinal para a síntese de vitelogenina, que as tornariam suscetíveis à infecção por *Babesia spp.* (AGBEDE *et al.*, 1986). No entanto, SANTOS *et al.* (1998), testando a capacidade de transmissão transovariana de *B. bigemina* por partenóginas de *B. microplus*, concluíram que essas fêmeas semi-ingurgitadas, coletadas de bovinos em fase clínica de babesiose, transmitem a infecção à sua progênie, mas aquelas coletadas de bovinos em fase subclínica, não transmitem. SANTOS *et al.* (1998) concluíram que diante de altas parasitemias, alguns protozoários conseguem infectar as células intestinais de fêmeas coletadas três dias antes de seu ingurgitamento e, posteriormente, atingir seus ovários e ovos. Essa transmissão foi constatada através de testes biológicos em bovinos sensíveis.

MAHONEY & MIRRE (1977) verificaram que a *B. bovis* começa a ser eliminada nos ovos de teleóginas desprendidas naturalmente do bovino a partir da 24^a hora de postura, estando em um percentual crescente até o 5^o dia quando então decresce. CAFRUNE *et al.* (1995), no entanto, verificaram que esses ovos infectados começam a ser eliminados a partir do 4^o dia de ovopostura. Segundo FRIEDHOFF & SMITH (1981), a *B. bigemina* começa a ser eliminada a partir da 16^a hora de postura. Assim, os ovos das primeiras horas de postura seriam livres de *Babesia spp.* FARIAS (1994) constatou a transmissão de *B. bigemina* por larvas originadas de ovos das primeiras 24 horas de postura, sem haver, no entanto, a transmissão de *B. bovis*.

LARANJA *et al.* (1975) infestaram ovinos, caprinos, eqüinos e bovinos sensíveis com larvas de *B. microplus* naturalmente infectados com *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale*. As progênies das teleóginas obtidas nos hospedeiros não habituais foram utilizadas para infestar bovinos sensíveis e não houve transmissão dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina. Essa seria uma técnica de obtenção de cepas de *B. microplus* livres de *Babesia spp.* Entretanto, CALLOW (1965) verificou que as progênies de teleóginas ingurgitadas em eqüinos, ovinos e caprinos transmitem *B. bigemina* a bovinos sensíveis.

O mesmo foi constatado por FARIAS (1994) quanto à *B. bovis*, após a passagem do carrapato em ovinos.

Esses caracteres biológicos específicos dos protozoários *B. bovis* e *B. bigemina*, uma vez bem conhecidos, permitem o isolamento de cepas puras a partir de carrapatos de campo, com infecção mista, e a obtenção de cepas de carrapatos livres de *Babesia spp.* As cepas de *B. microplus* não infectadas são imprescindíveis para a maioria dos estudos de biologia e epidemiologia da *Babesia spp.* Até então, os grupos de pesquisa dependiam de esterilização química do carrapato através de tratamento babesicida do bovino hospedeiro (KUTTLER, 1975 e FARIAS, 1994), ou da obtenção esporádica de cepas naturalmente livres. Baseados nestes dados e nas controvérsias existentes, o presente trabalho objetivou o estudo de parte do ciclo evolutivo da *B. bovis* no seu hospedeiro invertebrado, testando a capacidade de transmissão transovariana por partenóginas de *B. microplus*, e a busca de uma possível técnica simplificada para obter variedades de carrapatos livres de *Babesia spp.*

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Setor de Entomozooses da Faculdade de Veterinária da UFRGS, em Porto Alegre, RS, Brasil. Foram utilizados um total de dez terneiros, oriundos de região livre de carrapato, e sorologicamente negativos a *Babesia spp.* A cepa de carrapato utilizada é originária do município de Santa Vitória do Palmar – RS, e naturalmente livre de *Babesia spp.* Posteriormente, essa cepa foi infectada com isolado puro de *B. bovis* (FARIAS, 1994). Para a obtenção de carrapatos ingurgitados durante a fase subclínica de babesiose, dois terneiros não esplenectomizados e já portadores de *B. bovis* receberam, cada um, três infestações com 10.000 larvas infestantes em dias alternados. Assim, esses bovinos receberam um total de 30.000 larvas de *B. microplus* infectadas com *B. bovis*. No 12^o dia após a primeira infestação, foram inoculados, via endovenosa, com 6ml de sangue previamente congelado em nitrogênio líquido, contendo *B. bovis* entre $15,5 \times 10^7$ e 27×10^7 Unidades Infectantes/ml de sangue.

As partenóginas (fêmeas semi-ingurgitadas, com sulcos visíveis) foram coletadas a partir do 18^o dia após a primeira infestação, diretamente do corpo do animal, e as teleóginas após seu desprendimento natural do hospedeiro, a partir do 21^o dia. Foi considerada fase subclínica, quando os bovinos não apresentavam sinais como queda de hematócrito, elevação de temperatura e era detectada *Babesia spp.* nos esfregaços sanguíneos.

Para obtenção de carrapatos ingurgitados durante a fase clínica de babesiose, foram utilizados dois bovinos livres de *Babesia spp.* e esplenectomizados, os quais foram infestados com larvas também livres de *Babesia spp.*, para que a fase clínica não ocorresse antes do dia modal (dia de maior número de ínstares) de produção de partenóginas e teleóginas. Nesses terneiros foram inoculados 12mℓ de sangue congelado em nitrogênio líquido, contendo *Babesia bovis* entre $15,5 \times 10^7$ e 27×10^7 Unidades Infectantes/mℓ. As demais etapas, como número de infestações, método de inoculação e coletas de partenóginas e teleóginas foram as mesmas utilizadas para a fase subclínica. Foi considerada fase clínica, quando os bovinos apresentavam sintomas como queda de hematócrito, elevação de temperatura e presença de *B. bovis* nos esfregaços sanguíneos.

Os grupos de partenóginas foram identificados como P e os de teleóginas como T. De acordo com o grau de infecção dos bovinos (fase subclínica ou fase clínica), por ocasião da coleta dos ínstares de carrapatos, os grupos foram designados de s ou c. Assim, foram formados grupos Ps e Ts (partenóginas e teleóginas, respectivamente, coletadas de bovinos em fase subclínica de *B. bovis*), e grupos Pc e Tc (partenóginas e teleóginas, respectivamente, coletadas de bovinos em fase clínica de *B. bovis*). Cada grupo (Ps, Ts, Pc, Tc) contou com uma repetição que foi designada de a (Ps e Ts; Psa e Tsa; Pc e Tc; Pca e Tca), para a qual foi utilizado outro bovino infestado com a metodologia referida anteriormente.

Os grupos P foram constituídos por 20 partenóginas com um peso total de 1 grama e contaram com 7 repetições. Os grupos T, constituídos de 10 teleóginas com peso total de 3 gramas, contaram com 5 repetições. Todos os grupos foram incubados em placas de Petri, a 27°C e umidade relativa do ar superior a 70%, e no 5º dia de postura foram realizados os exames de hemolinfa, baseados em MAHONEY & MIRRE (1971). Cada partenóquina ou teleóquina examinada foi considerada infectada ou não, sem ser avaliado o seu nível de infecção, pois, segundo CAFRUNE *et al.* (1995) e GUGLIELMONE *et al.* (1997), essa classificação parece ter maior importância epidemiológica, uma vez que foi detectada baixa relação entre o grau de infecção na hemolinfa e a taxa de infecção nos ovos.

No 20º dia de postura, foram selecionados os ovos férteis de cada grupo e, após uma homogeneização da massa de ovos, foram incubados em tubos de ensaio, em alíquotas de 0,5g a fim de se obterem larvas infestantes para o teste biológico com os bovinos. Foram utilizados 6 bovinos, nos testes biológicos, com aproximadamente 6 meses de idade, e

sorologicamente negativos a *Babesia spp.* Posteriormente, foram esplenectomizados. Os terneiros foram mantidos em baias individuais e isoladas com telas, para evitar infecções acidentais por hematozoários, além de *Anaplasma marginale* e *Eperythrozoon sp.* Desses bovinos, 4 foram infestados com larvas oriundas dos grupos P, sendo os demais (2) utilizados para testar a progênie dos grupos T.

Todos os animais utilizados no teste biológico tiveram acompanhamento clínico diário, até o final da produção de teleóginas (25 - 27 dias pós infestação), através de tomadas de temperatura retal, hematócrito e esfregaço sanguíneo, observando-se, assim, a inoculação ou não de *Babesia bovis* pela progênie dos diferentes grupos. Para os testes sorológicos, foram coletados 20mℓ de sangue sem anticoagulante de cada bovino utilizado no teste biológico, antes de serem infestados e 30 dias após o término de produção de teleóginas. O soro oriundo desse sangue, após centrifugação, foi enviado para o Instituto de Pesquisas Desidério Finamor - Guaíba - RS, onde foi realizado o teste de ELISA, segundo ROITT *et al.* (1989), para a detecção de anticorpos anti-*Babesia*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, observa-se que as partenóginas coletadas de bovinos em fase subclínica por *B. bovis* (grupos Ps e Psa) foram negativas no exame de hemolinfa. A ausência da infecção e, conseqüentemente, de transmissão transovariana, foi confirmada pelo acompanhamento clínico dos bovinos utilizados no teste biológico. A prova sorológica revelou ausência de anticorpos anti-*Babesia* nesses animais, o que confirma a ausência de *B. bovis* na progênie das partenóginas.

Tabela 1 - Infecção de partenóginas e teleóginas de *Boophilus microplus*, alimentadas em bovinos na fase subclínica de babesiose por *Babesia bovis*, e a capacidade de transmissão do protozoário.

Grupo	% de ínstares positivos ao exame de hemolinfa	Teste Biológico	Elisa <i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>
Ps	00	-	-	-
Ts	16	+	+	-
Psa	00	-	-	-
Tsa	09	+ *	NR	NR

Ps - Partenóginas coletadas de bovinos com *Babesia bovis* em fase subclínica.
Ts - Teleóginas coletadas de bovinos com *Babesia bovis* em fase subclínica.
a - repetição.

* - Morreu durante a fase aguda da doença.

NR - Não realizado.

As teleóginas, de ambos os grupos, (Ts e Tsa), foram positivas e revelaram no exame de hemolinfa um percentual de infecção de 16% e 9% respectivamente (Tabela 1). No teste biológico, demonstraram transmissão de *B. bovis* para os bovinos, sendo que o período de incubação variou entre 9 e 12 dias, com temperatura retal atingindo 41,3°C. Esses resultados confirmam os dados descritos por MAHONEY (1977), quanto ao período de incubação.

O teste sorológico revelou a presença de anticorpos anti-*B. bovis* e a ausência de anticorpos anti-*B. bigemina*, confirmando que a infecção dessa cepa de carrapatos foi exclusivamente por *B. bovis*. Portanto, as partenóginas coletadas de bovinos durante a fase subclínica de *B. bovis* não desenvolveram infecção com esse protozoário, concordando, assim, com os resultados obtidos por CALLOW (1968) quanto a *B. Bigemina*; segundo esse autor somente nas últimas 16 a 24 horas de hematofagismo é que o carrapato se infecta com o protozoário. Resultados similares foram verificados por SANTOS *et al.* (1998) os quais constataram que partenóginas de *B. microplus* ingurgitadas em bovinos em fase subclínica de babesiose por *B. bigemina* não transmitem a infecção à sua progênie. As partenóginas não transmitiram *B. bovis*, talvez porque os processos digestivos nas fases iniciais de ingurgitamento sejam mais rápidos, destruindo, assim, os patógenos como sugerem POLIANSKI & KHEISIN (1959), ou devido às células basofílicas do intestino não estarem suscetíveis à invasão do protozoário (AGBEGE *et al.* 1986). No entanto, as teleóginas ingurgitadas nesses bovinos durante fase subclínica de *B. bovis* foram capazes de se infectar e transmitir a infecção, confirmando os resultados de CAFRUNE *et al.* (1995) que constataram infecção por *B. bovis* em ovos postos por teleóginas ingurgitadas em bovinos com parasitemias entre 0,01 e 0,02%.

No grupo Tsa, (teleóginas coletadas em fase subclínica por *B. bovis* - repetição) apesar do percentual de infecção relativamente baixo (9%) das teleóginas em nível de hemolinfa, sua progênie foi capaz de transmitir *B. bovis* no teste biológico. O bovino infestado com essas larvas apresentou sintomas como: anorexia, elevação de temperatura, queda de hematócrito, ataxia e incoordenação motora, também descritos por LOSOS (1986); e no 9º dia após a infestação, através de exame direto, foi detectado *B. bovis* no sangue coletado da veia jugular. Esse período de incubação confirma o descrito por MAHONEY (1977), o qual afirmou que a *B. bovis* alcança níveis detectáveis no sangue periférico entre 8 a 16 dias após a fixação do carrapato.

Na tabela 2, observa-se que os grupos de partenóginas (Pc – partenóginas coletadas em fase clínica por *B. bovis* e Pca - repetição) foram negativos no exame de hemolinfa, sendo confirmada a ausência de infecção através do teste biológico, pois os bovinos utilizados não manifestaram alterações significativas de temperatura, hematócrito, e não foi detectado o protozoário no exame direto, nem anticorpos anti-*Babesia* no teste sorológico.

Os grupos Tc (teleóginas coletadas em fase clínica por *B. bovis*) e Tca (repetição) revelaram no exame de hemolinfa, um percentual de infecção de 80% e 85%. Esses resultados, quando comparados com os dos grupos Ts e Tsa (percentual de infecção de 16% e 9%), - tabela 1, concordam com os de RISTIC *et al.* (1981), os quais afirmaram que o percentual de fêmeas de carrapato infectadas, depende do grau de parasitemia no sangue do hospedeiro durante o final do ingurgitamento. Assim, não foi realizado o teste biológico da progênie das teleóginas (Tc e Tca), pois os resultados obtidos no exame de hemolinfa confirmaram a infecção do carrapato.

Os resultados foram similares aos constatados nos carrapatos ingurgitados em bovinos em fase subclínica de infecção por *B. bovis*. Esse protozoário, mesmo em fase clínica, atinge parasitemias muito baixas, e os poucos parasitas ingeridos talvez sejam insuficientes para transpor a barreira intestinal descrita por AGBEDE *et al.* (1986) e POLIANSKI & KHEISIN (1959) e atingir o ovário das partenóginas. A transmissão transovariana depende do nível de parasitemia do hospedeiro, o que é confirmado pelo fato de que, nas partenóginas ingurgitadas em bovino em fase clínica por *B. bigemina* (altas parasitemias), alguns protozoários sobrevivem e garantem a transmissão transovariana, enquanto que naquelas ingurgitadas em bovinos em fase subclínica

Tabela 2 - Infecção de partenóginas e teleóginas de *Boophilus microplus*, alimentadas em bovinos na fase clínica de babesiose por *Babesia bovis*, e a capacidade de transmissão do protozoário.

Grupo	% de ínstares positivos ao exame de hemolinfa	Teste biológico	Elisa <i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>
Pc	00	-	-	-
Tc	85	NR	NR	NR
Pca	00	-	-	-
Tca	80	NR	NR	NR

Pc - Partenóginas coletadas de bovino com *Babesia bovis* em fase clínica.

Tc - Teleóginas coletadas de bovino com *Babesia bovis* em fase clínica.

a - repetição.

NR - Não realizado.

não ocorreu essa transmissão (SANTOS *et al.*, 1998). *B. bovis*, no entanto, não é transmitida transovarianamente por partenóginas se quer ingurgitadas em fase clínica de babesiose. Esses resultados permitem recomendar a utilização de ovos postos por partenóginas (fêmeas semi-ingurgitadas) como uma técnica extremamente simplificada e eficaz para a obtenção de cepa de *B. microplus* livre da infecção por *Babesia spp.*, alternativa para a técnica de utilização dos ovos das primeiras 24 horas de postura, que, segundo FARIAS (1994) podem estar infectadas por *B. bigemina*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBEDE R.I.S., KEMP, D.H., HOYTE, H.M.D. *Babesia bovis* infection of secretory cells in the gut vector tick *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology*, v.16, n.2 p.109-114, 1986.
- CAFRUNE, M.M., AGUIRRE, D.H., MANGOLD, A.J., *et al.* Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. *Research Veterinary Science*, v.58, p.284-285, 1995.
- CALLOW, L.L. *Babesia bigemina* in ticks grown on non-bovine host and its transmission to these hosts. *Parasitology*, v.55, p.375-381, 1965.
- CALLOW, L.L. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. *Parasitology*, v.58, p.663-670, 1968.
- FARIAS, N.A.R. **Efeito diferencial de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* sobre a capacidade reprodutiva do vetor *Boophilus microplus***. Rio de Janeiro, 1994. 134p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz, 1994.
- FRIEDHOFF, K.T., SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. *Babesioses*. New York: Academic, 1981. p.267-322.
- GUGLIELMONE, A.A., GAIDO, A.B., AGUIRRE, D.H., *et al.* Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Parasite*, v.4 p.337 - 341, 1997.
- KUTTLER, K.L., GRAHAM, O.H., TREVINO, J.L. The effect of imidocarb treatment on *Babesia* in the tick (*Boophilus microplus*). *Research Veterinary Science*, v.18, p.198-200, 1975.
- LARANJA, R., ARRIEGUI, L., ARTECHE, C.C.P. Transmissão dos agentes da tristeza parasitária dos bovinos após passagem de *Boophilus microplus* em hospedeiros não habituais. *Boletim IPVDF*, v.3, n.1, p.113-123, 1975.
- LOSOS, G.J. Babesiosis. In: LOSOS, G.J. **Infections tropical diseases of domestic animals**. Canada : Longman Scientific, Technical, 1986. p.1-97.
- MAHONEY, D.F., MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: Estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.65, n.3, p.309-317, 1971.
- MAHONEY, D.F. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. New York : Academic 1977. V.4, Cap.1, p.1-52.
- MAHONEY, D.F., MIRRE, G.B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *Babesia argentina*). *Research in Veterinary Science*, v.23, p.126-127, 1977.
- POLIANSKI, I.I., KHEISIN, E.M. Some observations on the development of *Babesia bovis* in the tick vector. *Karel Fil Akad Nauk* v.14, p.5-13. 1959.
- RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith, Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Australian Journal of Agricultural Research*, v.15, p.802-821, 1964.
- RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Australian Journal of Agricultural Research*, v.17, p.247-254, 1966.
- RISTIC, M., SMITH, R.D., KAKOMA, I. Characterization of *Babesia* antigens derived from cell cultures and ticks. In: RISTIC, M. KREIER, J. P. **Babesioses**. New York : Academic, 1981. p.337-380.
- ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. **Imunologia**. São Paulo : Manole, 1989. p.355.
- SANTOS, T.R.B., GONZALES, J.C., CHIES, J.M., *et al.* Transmissão transovariana de *Babesia bigemina* por partenóginas de *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.7, n.1, p.7-10, 1998.
- YOUNG, A.S., MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, v.2, n.8, p.211-219, 1986.